

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Pediatría



**INFECCIONES RESPIRATORIAS POR VIRUS
EMERGENTES.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

M^a Luz García García

Bajo la dirección del doctor

Ángel Nogales Espert

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-0664-2



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

INFECCIONES RESPIRATORIAS POR VIRUS EMERGENTES

TESIS DOCTORAL

M^a Luz García García
MADRID, 2008

**DON MANUEL MORO SERRANO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO
DE PEDIATRÍA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

CERTIFICA:

Que **Doña María Luz García García** ha realizado en el Departamento de Pediatría, bajo la dirección del Prof. Ángel Nogales Espert, el trabajo titulado "**Infecciones respiratorias por virus emergentes**".

Este Estudio se encuentra terminado y reúne las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral

Madrid, 2 de julio de 2.008



**DON ÁNGEL NOGALES ESPERT, CATEDRÁTICO DE PEDIATRÍA DE
LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

HACE CONSTAR:

Que **Doña María Luz García García** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Infecciones respiratorias por virus emergentes”**, que se encuentra terminado y reúne las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Madrid, 2 de julio de 2.008

A handwritten signature in blue ink is written over a circular official stamp. The stamp contains the text "UNIVERSIDAD COMPLUTENSE" at the top, "DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA" on the right, and "FACULTAD DE MEDICINA" at the bottom. In the center of the stamp is a small emblem featuring a crown and a shield.

A mi marido y a mis hijas

A mis padres, a quienes les debo todo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Profesor D. Ángel Nogales Espert su dedicación, claridad expositiva y su acertado criterio en la dirección de esta tesis.

A Cristina Calvo por su gran esfuerzo, colaboración y ayuda en la revisión crítica de este manuscrito.

A Pilar Pérez-Breña, Inmaculada Casas y Francisco Pozo, sin cuya colaboración no hubiera sido posible realizar estos estudios.

A los pacientes y a sus padres, que han aportado lo más importante de nuestros estudios.

A todas las enfermeras que a lo largo de estos años han trabajado en el Servicio de Pediatría, por colaborar recogiendo muestras respiratorias a todos los niños ingresados.

A todos los médicos adjuntos y residentes que han trabajado en el Servicio de Pediatría por colaborar en la recogida de los datos clínicos.

A José Ramón Villa por valorarme siempre en más de lo que merezco.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Infecciones respiratorias por virus clásicos	5
1.1. Paramyxoviridae	5
1.1.1. Virus respiratorio sincitial	7
- Epidemiología	7
- Manifestaciones clínicas	9
1.1.2. Virus Parainfluenza	11
- Epidemiología	12
- Manifestaciones clínicas	14
1.2. Orthomyxoviridae	15
1.2.1. Virus Influenza	15
- Epidemiología	15
- Manifestaciones clínicas	20
1.3. Adenoviridae	21
1.3.1. Adenovirus	21
- Epidemiología	22
- Manifestaciones clínicas	23
- Síndromes clínicos asociados a la infección por adenovirus	24
1.4. Coronaviridae	26
1.4.1. Coronavirus	26
- Epidemiología	28
- Manifestaciones clínicas	29
2. Infecciones respiratorias por virus respiratorios emergentes	31
2.1. Metapneumovirus humano	31
- Epidemiología	32
- Manifestaciones clínicas	33
2.2. Bocavirus humano	34
- Epidemiología	35
- Manifestaciones clínicas	35
2.3. Rinovirus	36

- Epidemiología	38
- Manifestaciones clínicas	38
3. Consideraciones generales del diagnóstico de laboratorio	40
3.1. Las muestras clínicas	40
3.2. Métodos diagnósticos directo	41
- Aislamiento en cultivo celular	41
- Técnicas de diagnóstico rápido por detección de antígeno	43
- Detección de ácidos nucleicos	46
3.3. Métodos diagnósticos indirectos: métodos serológicos	49
- Fijación del complemento	51
- Inhibición de la hemaglutinación	51
- Inmunofluorescencia indirecta y ELISA	51
- Neutralización	52
II. JUSTIFICACIÓN DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	53
- Origen de la línea de investigación	55
- Justificación e hipótesis	56
III. OBJETIVOS	57
- Objetivo general	59
- Objetivos específicos	59
IV. PUBLICACIONES	61
1. Human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain	69
2. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain.	69
3. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5.	77
4. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain.	85
5. Human bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of	89

children without clinical symptoms of respiratory infection.	
6. Detection of human bocavirus in ill and healthy Spanish children. A 2-year study	93
7. Clinical characteristics of human bocavirus infections in Spanish children compared with other respiratory viruses	97
8. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain	99
 V. DISCUSIÓN INTEGRADORA	 103
1. Metapneumovirus humano	105
2. Bocavirus humano	111
3. Rinovirus	121
4. Relación virus y asma	125
 VI. CONCLUSIONES	 129
 VII. BIBLIOGRAFÍA	 135

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

EIA: enzimoimmunoanálisis

ELISA: enzyme-linked Immunosorbent assay

HBoV: bocavirus humano

HCoV: coronavirus humano

hMPV: metapneumovirus humano

IC: inmunocromatografía

IF: inumofluorescencia

IRA: infección respiratoria aguda

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR-EIA: PCR acoplada a enzimoimmunoanálisis

RT-PCR: transcripción reversa de la polimerasa en cadena

SARS: síndrome de distres respiratorio agudo grave

VPI: virus parainfluenza

VRS: virus respiratorio sincitial

PRESENTACIÓN

Miles de niños se ven afectados cada año por alguna infección respiratoria. Hasta el momento, las infecciones respiratorias de vías aéreas inferiores siguen siendo una de las principales causas de muerte en niños pequeños, ocasionando, según estimaciones de la Organización Mundial de La Salud, dos millones de fallecimientos anuales en la población pediátrica mundial. Además, las infecciones respiratorias tienen un gran impacto en los parámetros de calidad de vida de los niños y en los costes sanitarios, ya que son una de las causas más frecuentes de hospitalización pediátrica y ocasionan un gran número de consultas médicas, tanto en atención primaria como en los servicios de urgencias hospitalarios¹.

La mayoría de las infecciones respiratorias infantiles son de etiología viral. La evaluación y el manejo de un niño con una infección respiratoria, sobre todo si ésta es de vías aéreas inferiores, supone un reto ya que no sólo las manifestaciones clínicas de las infecciones por virus, bacterias o bacterias atípicas pueden solaparse, sino que también ocurren frecuentemente infecciones mixtas. Las herramientas diagnósticas, como los test virales rápidos, las radiografías de tórax y la analítica sanguínea varían en cuanto a validez, coste y utilidad en el paciente ambulatorio y en el hospitalizado. Un objetivo fundamental en el tratamiento de las infecciones respiratorias es el uso selectivo y apropiado de antibióticos. Sin embargo, es casi imposible alcanzar esta meta si no se dispone de métodos fiables y rápidos para identificar patógenos específicos virales o bacterianos.

En este contexto, este trabajo pretende aportar el grano de arena de nuestra experiencia en el estudio de las infecciones respiratorias virales en el paciente pediátrico hospitalizado.

I.- INTRODUCCIÓN

Los virus son la causa de la mayoría de las infecciones de vías aéreas inferiores en los niños en edad preescolar y conllevan una morbilidad considerable en ancianos, inmunodeprimidos y en pacientes con enfermedades crónicas. También los virus son una de las principales causas de enfermedad respiratoria en niños escolares, adolescentes e incluso en adultos sanos. A pesar de ello, el impacto real, cualitativo y cuantitativo, de las infecciones causadas por virus comunes, adquiridos en la comunidad, ha sido siempre difícil de evaluar. Uno de los motivos ha sido la dificultad para diagnosticar clínicamente estas infecciones debido a la ausencia de métodos diagnósticos suficientemente sensibles y específicos para detectar los múltiples virus que infectan a la población. De hecho, hace escasamente una década, el diagnóstico de las infecciones virales se basaba fundamentalmente en las técnicas de inmunofluorescencia, cultivo celular y serología. En este contexto, el porcentaje de detecciones virales positivas en niños hospitalizados, oscilaba entre un 35 y un 45%.

Nuestro grupo publicó en 2001 un estudio llevado a cabo en más de 600 niños menores de dos años, ingresados por una infección respiratoria, detectando algún virus respiratorio en el 55,6% de los casos. Este porcentaje, uno de los más altos descritos hasta ese momento en la literatura, estaba compuesto fundamentalmente por el virus respiratorio sincitial (VRS), que suponía el 46,5% de los casos, seguido muy de lejos, por los virus parainfluenza con un 3,8%, adenovirus e influenza con un 2,4% y un anecdótico rinovirus con un 0,4%. La frecuencia relativa de cada uno de los agentes virales era similar a la descrita por otros autores en la literatura: el virus implicado con mayor frecuencia en las infecciones respiratorias del niño pequeño era, con mucha diferencia, el VRS, seguido a considerable distancia por los virus parainfluenza, adenovirus e influenza. El rinovirus parecía jugar un papel marginal en las infecciones respiratorias graves de los niños^{2,3,4}.

Sin embargo, este panorama está cambiando sustancialmente en los últimos años. Los últimos virus descubiertos fueron los coronavirus en la

década de los años sesenta, hasta que la aplicación de las nuevas tecnologías al diagnóstico de las infecciones virales, fundamentalmente la implantación y perfeccionamiento de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido ampliar nuestra visión en cuanto a la etiología de las infecciones respiratorias. Así, desde el comienzo del último milenio las familias *Paramyxoviridae* y *Coronaviridae* se han visto ampliadas con la incorporación del metapneumovirus humano (hMPV)⁵, del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV)⁶ y de dos coronavirus humanos identificados en Holanda (HCoV-NL63)⁷ y Hong Kong (HCoV-HKU1)⁸. Por último, en el año 2.005 se describió un nuevo virus DNA, denominado bocavirus humano (HBoV)⁹ y en el año 2.007 se han identificado dos virus, también DNA, pertenecientes al grupo de los polyomavirus^{10,11}.

En esta Tesis se describirán dos de los nuevos virus descritos recientemente: metapneumovirus humano y bocavirus humano, y se revisarán aspectos nuevos relativos a la clínica y a la epidemiología del rinovirus, un gran desconocido hasta ahora en Pediatría.

Antes de pasar a la exposición del estudio y, con la finalidad de establecer referencias, realizaremos una descripción sucinta de la epidemiología y de las manifestaciones clínicas de las infecciones respiratorias ocasionadas por los virus clásicos, la mayoría de los cuales pertenecen a las familias *Paramyxoviridae* (VRS y parainfluenza), *Orthomyxoviridae* (influenza), *Adenoviridae* (adenovirus) y *Coronaviridae* (coronavirus).

Posteriormente, se realizará una breve introducción a los virus emergentes, objeto de esta Tesis: metapneumovirus humano, bocavirus humano y rinovirus.

Por último, dado que una parte importante de los resultados de esta Tesis se basa en las técnicas de diagnóstico virológico, se revisarán los aspectos más relevantes de las herramientas diagnósticas habituales.

1. VIRUS RESPIRATORIOS CLÁSICOS

1.1. *PARAMYXOVIRIDAE*

La mayoría de los patógenos responsables de las epidemias de infecciones respiratorias pertenecen a esta familia, que a su vez forma parte del orden *Mononegavirales*.

Los paramixovirus son virus pleomórficos, esto es, existen múltiples formas morfológicas en la población viral. Todos los virus *paramyxoviridae* son virus envueltos, es decir, están rodeados por una envoltura derivada de una célula huésped. La envoltura contiene epítomos rodeando la nucleocápside, que actúan como antígenos induciendo la síntesis de anticuerpos neutralizantes y por tanto, favoreciendo en cierto modo la resistencia a la infección (Figura1).

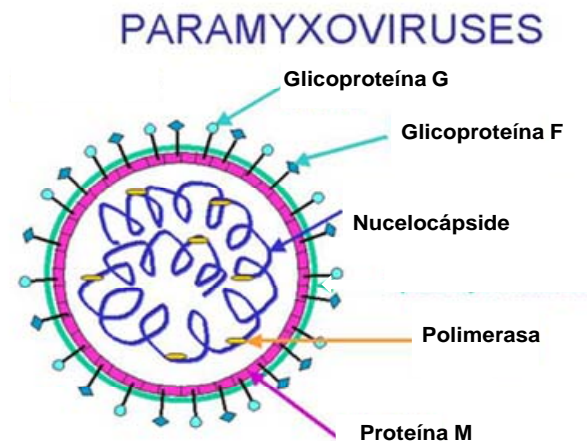


Figura1. Estructura de un paramixovirus típico

(Tomado de pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter4.htm)

Su genoma está compuesto por una única cadena de ácido ribonucleico (ARN) no segmentado, con polaridad negativa y simetría helicoidal. El ARN de sentido negativo tiene una secuencia de nucleótidos complementaria del ARN mensajero que va a codificar y como el ADN no puede traducirse directamente en proteína, antes debe transcribirse en ARN de sentido positivo, que actúa como ARN mensajero. Por ello los paramixovirus, y también los ortomixovirus, deben transportar dentro del virión una transcriptasa de ARN (ARN-polimerasa) que produzca ARN(+) a partir del ARN.

Dentro de la familia *Paramyxoviridae* se diferencian dos subfamilias: *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. Ambas se diferencian fundamentalmente en la constitución del genoma: la familia *Paramyxovirinae* contiene 6 ó 7 genes, mientras que la familia *Pneumovirinae* posee un genoma más complejo y alberga 10 genes¹². Varios virus muy frecuentes en Pediatría, como los parainfluenza, VRS y hMPV, están incluidos en la familia *Paramyxoviridae* (Figura 2).

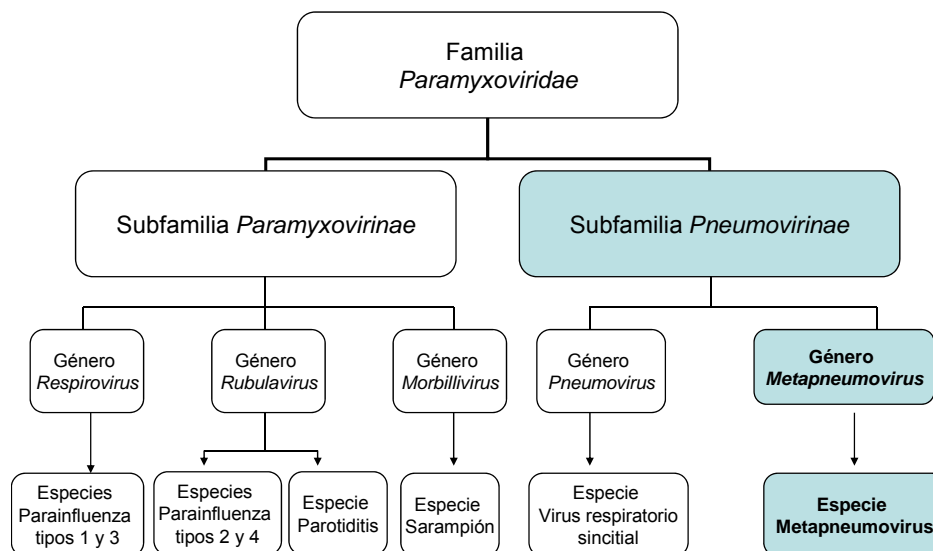


Figura 2. Clasificación de los virus de la Familia Paramyxoviridae que afectan a humanos

1.1.1. Virus respiratorio sincitial

El VRS fue aislado en 1.956 en Washington, en una colonia de chimpancés y en los trabajadores que cuidaban de ellos¹³. Recibe su nombre de su tendencia a formar sincitios en los cultivos de los tejidos. Tras su descripción inicial, varios estudios seroepidemiológicos demostraron que el VRS era la causa más importante de infecciones respiratorias de vías bajas en los primeros años de la vida.

En su estructura se distingue una nucleocápside, formada por el ARN genómico, que ha sido totalmente secuenciado y está compuesto por 10 genes, cada uno de los cuales codifica una proteína. Ocho de las diez proteínas son estructurales. Las glicoproteínas F (proteína de fusión) y G (proteína de anclaje) son los determinantes antigénicos mayores del virus, contra las que se dirigen los anticuerpos neutralizantes. La proteína G interviene en adhesión del virus al receptor celular, mientras que la proteína F es la responsable de la penetración viral y de la formación de sincitios. La proteína hidrofóbica pequeña (SH), la proteína de la matriz (M) y la proteína M2 están relacionadas con la envuelta viral. Por otro lado, las nucleoproteínas N y L y la fosfoproteína P, están presentes en la nucleocápside. Por último, las proteínas NS1 y NS2 son proteínas no estructurales, que se encuentran únicamente en las células infectadas, pero no en los viriones¹⁴ (Figura 3).

Se han identificado 2 grupos principales de VRS, el grupo A y el B, con diferencias antigénicas en las proteínas G, F, N, y P. Además existe una considerable diversidad antigénica, con diversos linajes dentro de ambos grupos.

Epidemiología

Las infecciones por VRS continúan siendo, por su elevada frecuencia, uno de los problemas más importantes en la infancia. La mayoría de los niños se infectan por VRS durante su primera temporada epidemiológica y aproximadamente el 20% de ellos sufren algún episodio

de sibilancias asociado a VRS en el primer año de vida. Las tasas de hospitalización en lactantes se sitúan en torno a un 2-3%¹⁵. El pico de máxima incidencia ocurre entre los 2 y 3 meses de edad.

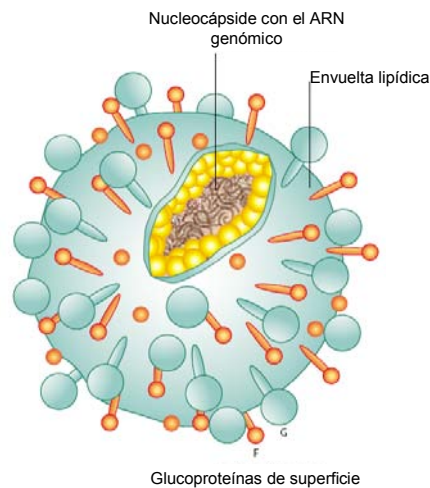


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del VRS.

Adaptado de referencia 17

Los humanos son la única fuente de infección del virus, que es altamente transmisible. Suele diseminarse por contacto directo con secreciones respiratorias de individuos infectados o indirectamente, mediante el contacto con fómites o superficies contaminadas. De cualquier manera, precisa de un contacto estrecho para transmitirse. Puede sobrevivir hasta 6 horas en superficies, 2 horas en los guantes y hasta 20 minutos en la piel. Es relativamente frecuente la transmisión intrahospitalaria a partir de personal sanitario infectado, que con frecuencia es asintomático¹⁶.

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que los grupos A y B pueden detectarse en una comunidad durante la misma epidemia, aunque uno de ellos sea el predominante. Se ha observado un patrón

característico de alternancia de ambos grupos, con un predominio del grupo A durante dos temporadas consecutivas, seguida por una epidemia anual del grupo B. También se ha descrito la circulación simultánea de varios genotipos. Los más frecuentes son el GA5 del grupo A y el GB13 del grupo B. Aunque ha sido motivo de controversia durante años, parece que no existen diferencias significativas en cuanto a gravedad entre los distintos grupos y/o genotipos del VRS¹⁷.

La distribución mensual de las infecciones por ambos grupos es similar, con un pico de máxima incidencia en los países de clima templado en los meses de invierno, desde noviembre a enero. Sin embargo, el aislamiento ocasional de VRS durante los meses de verano, hace pensar que este virus está presente en la comunidad durante todo el año¹⁸. En los países tropicales las epidemias tienen lugar en la época de las lluvias.

Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico asociado a las infecciones por VRS varía con la edad. La infección primaria contraída entre las 6 semanas y los 2 años de vida es con frecuencia sintomática, aunque el espectro de manifestaciones varía desde una infección leve de vías respiratorias altas a una bronquiolitis o neumonía graves. También se ha implicado al VRS en las exacerbaciones asmáticas. En cambio, las reinfecciones posteriores en los niños en edad escolar suelen ser casi siempre leves.

La bronquiolitis es sin duda la manifestación más conocida de la infección por VRS debido a su enorme impacto en los lactantes. Se estima que la tasa de hospitalización por bronquiolitis asociada a VRS en Europa, ronda los 30/1.000 niños menores de un año, con una tasa de mortalidad de 2 por cada 100.000 nacidos vivos¹⁹. En general, tras un breve periodo prodrómico con síntomas respiratorios de vías altas, aparecen bruscamente sibilancias, disnea, dificultad respiratoria, taquipnea y evidencia radiológica de hiperinsuflación pulmonar. En la mayoría de los casos, los síntomas se resuelven en menos de una semana, aunque los niños más pequeños pueden precisar hospitalización

de duración variable. En algunas series más de la mitad de los niños con bronquiolitis por VRS presentan simultáneamente otitis media aguda²⁰.

La afectación clínica de los neonatos raramente incluye sibilancias, siendo en cambio relativamente frecuente la apnea como único síntoma de la infección. La presencia de apnea no parece indicar diseminación del virus al sistema nervioso central y no es específica del VRS. Otras complicaciones neurológicas que también han sido descritas son encefalopatía y convulsiones. En los niños con bronquiolitis grave puede desarrollarse un síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética, con alteraciones electrolíticas, sobre todo hiponatremia, que a su vez puede favorecer la aparición de convulsiones. También es frecuente la neumonía en las infecciones neonatales por VRS, habiéndose detectado este virus hasta en el 55% de los menores de 1 mes con neumonía.

Varios factores se han asociado con mayor riesgo de infecciones graves por VRS: edad inferior a 6 semanas, prematuridad, especialmente si se acompaña de enfermedad pulmonar crónica, inmunodeficiencias, cardiopatías congénitas, malnutrición, tabaquismo pasivo, hacinamiento en el hogar, etcétera²¹.

Especial mención merece la asociación epidemiológica entre bronquiolitis viral y el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes y/o asma. Esta posible relación ha sido postulada fundamentalmente para el VRS. Sin embargo, aunque se han publicado numerosos estudios relacionando las infecciones por VRS y el desarrollo posterior de asma, la metodología empleada es tan diversa que es muy difícil extraer conclusiones claras. A pesar de todo, hay dos estudios prospectivos clásicos, que han podido documentar que el antecedente de bronquiolitis por VRS es un factor de riesgo indiscutible para el desarrollo de sibilancias recurrentes y asma diagnosticado por un médico^{22,23}.

Se han propuesto dos posibles explicaciones para esta asociación. La primera de ellas es que el VRS afecta de alguna manera los sistemas

respiratorio e inmunológico inmaduros del lactante, predisponiéndole a infecciones respiratorias recurrentes con secuelas pulmonares e inmunológicas. La segunda hipótesis es que algunos lactantes podrían tener una función pulmonar previamente disminuida o bien, una susceptibilidad genética o inmunológica para el desarrollo de síntomas respiratorios recurrentes. Es posible que el verdadero mecanismo sea una combinación de ambas teorías²⁴.

Clásicamente se ha pensado que el VRS debía tener alguna característica especial que favoreciera el desarrollo de asma. Sin embargo, recientemente se ha observado que la bronquiolitis por otros virus respiratorios también puede asociarse con asma posterior, incluso con mayor frecuencia que el VRS²⁵. Este punto se comentará en profundidad más adelante.

1.1.2. Virus parainfluenza

En 1954 Robert Chanock aisló el primer virus parainfluenza humano (VPI), el tipo 2 (VPI 2). El descubrimiento del VPI 1 y VPI 3 en 1958 amplió el conocimiento de la etiología de las infecciones de vías aéreas inferiores, completándose en 1960 con el aislamiento del VPI 4^{26,27}.

Los VPI son virus con genoma ARN no segmentado, que pertenecen a los géneros *Paramyxovirus* (VPI tipo 1 y tipo 3) y *Rubulavirus* (VPI tipos 2 y 4) de la familia *Paramyxoviridae*. La cubierta viral contiene dos glicoproteínas: la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y las proteínas de fusión (F), contra las que se dirige fundamentalmente la respuesta inmune. Las proteínas HN median la adhesión del virus a la célula diana, mientras que la proteína F favorece la fusión entre la cubierta del virus y la membrana celular²⁸.

Se han identificado 4 tipos serológicos: VPI 1 a 4 (con dos subtipos 4A y 4B), aunque VPI 1 y 3 por un lado, y VPI 2 y 4 por otro, están genéticamente más relacionados entre sí que con el resto de los VPI.

Epidemiología

Los cuatro tipos de VIP humanos son importantes patógenos del tracto respiratorio superior e inferior tanto en el niño como en el adulto. Cada tipo de VPI tiene unas características clínicas y epidemiológicas propias, aunque cualquiera de ellos puede ocasionar todo tipo de afectación respiratoria.

Las infecciones por los VPI son muy comunes y la mayoría de los niños presentan evidencia serológica de infección a los 5 años. Clásicamente se ha considerado que los VPI eran la segunda causa, tras el VRS, de infección viral de vías aéreas inferiores en la infancia. Los resultados de varios estudios de cohortes realizados en Estados Unidos entre los años 1970 y 1990, mostraron que las infecciones por VPI causaban el 65% de los casos de croup, el 20-40% de las infecciones respiratorias de vías bajas y el 20% de las infecciones de vías altas en niños preescolares^{29,32}. En un estudio poblacional más reciente se han informado tasas de hospitalización en niños menores de 5 años similares a las asociadas al virus de la gripe, con cifras en torno a 1/1.000 niños/año³⁰. Sin embargo, gracias a la espectacular mejoría de los métodos diagnósticos ocurrida en los últimos años, se sabe que, aunque los VPI son virus frecuentes en algunas infecciones respiratorias de los niños, no son en absoluto, uno de los más importantes, al menos en las infecciones con repercusión clínica significativa. Así, en un estudio publicado por nuestro grupo en el año 2.001, en 617 lactantes hospitalizados por infección respiratoria, VPI fue el segundo virus más frecuentemente detectado tras VRS. En cambio, en el año 2.006, en 1.322 lactantes ingresados, empleando métodos diagnósticos moleculares, nuestro grupo observó que VIP era el quinto virus en frecuencia, por detrás de VRS, hMPV, adenovirus e influenza³¹. Es de destacar además, que en este

estudio no se incluyeron rinovirus ni HBoV. La diferencia en los resultados, debida a la metodología diagnóstica empleada, nos ofrece una imagen más realista de la etiología de las infecciones respiratorias en el niño.

La edad a la que ocurre la primera infección es variable según el serotipo implicado. Las primeras infecciones por VPI 1 y VPI 2 son más frecuentes durante el segundo año de vida. En cambio, las infecciones por VPI 3 ocurren más precozmente y son el serotipo más frecuente en los primeros seis meses de la vida³².

Con respecto al VPI 4, a pesar de que los estudios de seroprevalencia han mostrado que el 50% de los niños de 6 años y el 70-90% de los adultos jóvenes tienen anticuerpos frente a él, la infección ha sido diagnosticada muy infrecuentemente, porque es el VPI con más dificultad para crecer en cultivos celulares³³. En una serie de pacientes pediátricos hospitalizados, publicada por nuestro grupo, se detectó VPI 4 con más frecuencia que VPI 2, asociándose además con infecciones graves de vías aéreas inferiores³⁴. Estos resultados sugieren que las infecciones por VPI 4 no son tan raras ni tan leves como previamente se había pensado.

Dado que las infecciones por VPI no confieren inmunidad completa, son frecuentes las reinfecciones a lo largo de toda la vida. Estas reinfecciones, que suelen ser leves, son la fuente principal de infecciones graves en lactantes y en pacientes con patología subyacente³⁵.

Algunos estudios recientes han identificado a los VPI como causa de infecciones nosocomiales, afectando a niños³⁶, ancianos³⁷ y pacientes inmunodeprimidos, especialmente a los receptores de trasplante de médula ósea³⁸. En estos pacientes, las infecciones suelen ser graves, con una mortalidad de 15 a 30% y, dado que pueden ser clínicamente similares a otras infecciones oportunistas, son frecuentemente infradiagnosticadas^{39,40}.

Los patrones estacionales de los VPI son bien conocidos. Los VPI 1 tienden a producir epidemias muy definidas, en los otoños de años alternos. Los brotes de infecciones por VPI 2, aunque más erráticos, suelen ocurrir en los meses de invierno, después de las infecciones por el tipo 1. Las infecciones por el VPI 3 son las más frecuentes, suelen aparecer anualmente y se detectan durante todo el año con un cierto predominio en los meses de primavera y verano. La circulación del VPI 4, debido a las dificultades que plantea su diagnóstico, está menos caracterizada, aunque diciembre y enero suelen ser los meses en los que se aísla con más frecuencia^{35,41,42}.

La transmisión viral ocurre por inoculación directa de secreciones contaminadas a través de las manos o mediante grandes partículas de aerosol que penetran a través de los ojos o la nariz, pero raramente por la boca. La prolongada supervivencia de los VPI en la piel, la ropa o los objetos, subraya la importancia de los fómites en las infecciones nosocomiales y el lavado de manos en el control de la infección⁴³.

Manifestaciones clínicas

Los VPI se asocian con un espectro de enfermedad similar al causado por el VRS, pero resultando en menor número de hospitalizaciones. La mayoría de las infecciones sintomáticas por VPI están causadas por VPI 1 y VPI 3.

VPI 1 es responsable de epidemias de croup y de infecciones respiratorias de vías altas en niños de 2 a 5 años. VPI 2 es numéricamente mucho menos importante en niños, pero también se asocia clínicamente con croup. Por el contrario VPI 3 es una causa importante de infección del tracto respiratorio inferior en lactantes, asociándose con frecuencia a bronquiolitis y neumonía en los primeros seis meses de vida.

Con respecto a las manifestaciones clínicas del VPI 4, las primeras referencias en adultos y niños sugerían que se asociaba con infecciones

leves de vías aéreas superiores, sin embargo, posteriormente se han descrito series de niños con infección del tracto respiratorio inferior por VPI 4, que han precisado hospitalización. Incluso se ha descrito una sepsis viral grave por VPI4 en un niño previamente sano. Las convulsiones febriles son uno de los síntomas no respiratorios más frecuentemente descritos en las infecciones por VPI 4^{34,44,45}.

1.2. ORTHOMYXOVIRIDAE

1.2.1. Virus influenza

Los virus influenza, concretamente los influenza A, fueron los primeros agentes virales patógenos aislados del tracto respiratorio. Los virus influenza son virus RNA, de simetría helicoidal con envoltura, pleomórficos, pertenecientes al grupo de los *Orthomyxovirus* (Figura 4). Tienen una gran diversidad antigénica. Existen tres tipos de virus influenza: A, B y C, si bien los tipos A y B son los agentes causales de los brotes epidémicos.

Los virus influenza A son los más ampliamente distribuidos y se clasifican en subtipos en base a las diferencias antigénicas de sus dos glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina y la neuraminidasa. Aunque existen 15 hemaglutininas (H1-H15) y 9 neuraminidasas (N1-N9), sólo los subtipos H1, H2, H3 y N1, N2 afectan de forma habitual al hombre y han sido los causantes de las epidemias y pandemias en la humanidad desde 1.900. Por el contrario, solo se reconoce un subtipo de hemaglutinina y neuraminidasa del virus influenza B. Ambas glicoproteínas mutan cada año y son las responsables del cambiante comportamiento epidemiológico del virus y de su capacidad infectiva. El subtipo H3N2 se reconoce como causante de epidemias más severas que H1N1 o que influenza B, originando mayores tasas de ingreso y mayor morbilidad⁴⁶. Los virus influenza A se clasifican en subtipos en base a sus diferencias serológicas

y genéticas respecto a sus glicoproteínas de superficie, hemaglutinina y neuraminidasa.

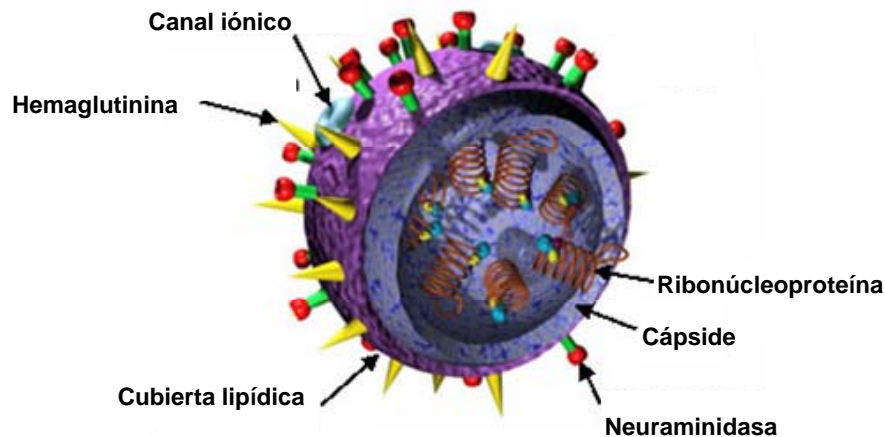


Figura 4. Estructura del virus influenza

(Tomado de www.answers.com/topic/influenza)

Actualmente están en circulación los subtipos H1N1 y H3N2 del virus influenza A, junto con los influenza B. La prevalencia de estos tres grupos de virus puede variar temporal y geográficamente dentro de un país, entre países y entre continentes durante una estación anual de gripe, aunque en términos generales las infecciones por influenza A son mucho más frecuentes que las B (75% vs 25%)⁴⁷.

Epidemiología

El gran impacto epidemiológico de los virus influenza se debe a dos tipos de variaciones antigénicas que ocurren en la hemaglutinina y neuraminidasa y que hacen al individuo susceptible a la infección por nuevas cepas. El primer tipo de variación antigénica, denominada *drift*, ocurre en los virus influenza A y B, y consiste en una serie de mutaciones puntuales en los genes de la hemaglutinina y neuraminidasa, que ocurren a lo largo del tiempo y que ocasionan un cambio gradual en el virus. Esto

le permite evadir el sistema inmune del huésped y convierte a todas las personas en susceptibles a estas infecciones durante toda la vida.

El otro tipo de variación, que sólo ocurre en el influenza A, denominada *shift*, consiste en un cambio brusco en las proteínas hemaglutinina y/o neuraminidasa, con la aparición de un nuevo subtipo de virus inmunológicamente diferente a los virus que han circulado en los años anteriores y frente a los que la población no tiene ninguna experiencia inmunológica, por lo que la extensión y gravedad de la infección son mayores, dando lugar a una pandemia. Este cambio ocurre cuando algunos subtipos de virus influenza A, que normalmente infectan animales (pájaros, cerdos, etc.) son transmitidos al hombre, intercambiando material genético con el virus influenza humano. El resultado es un nuevo virus completamente nuevo frente al que la humanidad está desprotegida.

La variación antigénica y el consiguiente ambiente epidemiológico creado sigue un patrón uniforme que hace que cada nueva variante reemplace a la anterior, de manera que la cocirculación de diferentes subtipos al mismo tiempo sólo ocurre en cortos períodos de tiempo.

Las características virológicas comentadas convierten a los virus influenza en únicos en cuanto a su capacidad para producir epidemias anuales recurrentes y pandemias que pueden afectar a todos los grupos de edad. El tamaño de la epidemia o pandemia y su impacto relativo, será consecuencia de la interrelación entre la variación antigénica del virus, el estado inmunitario protector de la población y la virulencia del virus.

El reservorio fundamental de todos los subtipos de virus influenza A conocidos son las aves acuáticas y la capacidad de estos virus para saltar la barrera de las especies es lo que hace que esta enfermedad no pueda considerarse como erradicable. El virus influenza B por el contrario, no tiene el potencial para producir pandemias porque no hay un reservorio animal del virus⁴⁸. La adhesión del virus a la célula susceptible se produce por la interacción entre la hemaglutinina y los receptores de ácido siálico

presentes en los glicolípidos y glicoproteínas de la superficie celular. La actividad sialidasa de la neuraminidasa evita que la hemaglutinina se una a los ácidos siálicos presentes en los mucopolisacáridos de las secreciones celulares que, de no ser así, interferirían con la adhesión del virus a los receptores celulares adecuados. El virus se introduce en la célula por un proceso de endocitosis. Posteriormente las vesículas procedentes de la endocitosis liberan el virus en el citoplasma y el ARN vírico migra al núcleo celular. Tras la transcripción de las hebras de ARN de sentido negativo en las de sentido positivo, a las hebras ARN⁺ se une en su extremo 5' un pequeño segmento de ARN celular que permite que comience su procesamiento como ARN mensajero en los ribosomas.

La síntesis de ARN y su unión a las nucleoproteínas tiene lugar en el núcleo celular, mientras que la síntesis de proteínas tiene lugar en el citoplasma. El ARN del virión unido a las nucleoproteínas abandona el núcleo celular y se dirige hacia la membrana junto con proteínas víricas transmembranares (hemaglutinina, neuraminidasa y proteínas M) y una capa subyacente de proteína M1 que se acumulan en determinadas regiones de la membrana celular y protruyen sobre la membrana en esas zonas, liberando finalmente un nuevo virus completo, con envoltura, en el fluido extracelular. Los virus influenza alcanzan el epitelio ciliado del tracto respiratorio, donde se multiplican y al que destruyen. Posteriormente, alcanzan las secreciones respiratorias y se propagan con las pequeñas partículas generadas con la tos, los estornudos, al hablar, etc. Una sola persona infectada puede transmitir el virus a un gran número de individuos susceptibles y extender rápidamente la infección, ya que el período de incubación es corto, de 1 a 4 días.

La duración media de las epidemias en invierno suele ser de unos dos meses y durante las mismas, las tasas de ataque en los niños son más elevadas que en ningún otro grupo de edad, pudiendo superar el 40% en los de edad escolar. El corto ciclo de replicación y la prolongada excreción del virus en los niños pequeños hacen que los escolares infectados jueguen un papel fundamental en la introducción del virus en

sus hogares⁴⁹. Sin embargo, con la creciente asistencia a guarderías, los lactantes y niños preescolares pueden convertirse en una fuente aún más importante de transmisión del virus en la comunidad. En este sentido, hay evidencias suficientes para afirmar que la vacunación antigripal es eficaz en interrumpir la transmisión familiar y comunitaria del virus de la gripe⁵⁰. También han sido publicados brotes de infección por influenza A en unidades de cuidados intensivos neonatales⁵¹.

Para conocer el impacto de los virus influenza sobre una población, se requieren estudios de varios años sucesivos, ya que la morbilidad puede ser diferente cada año. No obstante, diversos estudios de base poblacional, han referido tasas de hospitalización y de consultas médicas en niños, relacionadas con la gripe, mucho más altas de las esperadas, en torno a 0,9/1.000 niños⁵². De hecho, en algunas series se ha comprobado que las tasas de ingreso por gripe, en los niños menores de 5 años, sólo son superadas por el grupo de ancianos mayores de 85 años y son máximas en los menores de 6 meses^{53,54}.

La repercusión económica de las infecciones por influenza en el niño, incluyendo las infecciones de los contactos familiares del niño enfermo, con la consiguiente pérdida días de trabajo e incluso transmisión de la enfermedad en el lugar de trabajo, sobrepasa con mucho los costes directos derivados de la infección pediátrica y posiblemente no han sido adecuadamente valorados. Un estudio reciente, utilizando confirmación virológica, comparó los efectos de la infección por influenza con los otros virus respiratorios. Los resultados mostraron que por cada niño con gripe, los padres pierden una media de 1,34 días de trabajo para cuidar del niño enfermo, más 0,36 días por su propia enfermedad. Además la tasa de infección secundaria en caso de gripe es significativamente más alta que para el resto de los virus respiratorios⁵⁵.

Manifestaciones clínicas

La presentación clínica de la gripe en niños pequeños es bastante inespecífica, acompañándose de fiebre con mayor frecuencia que otras infecciones víricas y siendo éste a veces el único síntoma, sobre todo en lactantes menores de 6 meses, en los que puede simular una sepsis bacteriana⁵⁶. Otros síntomas habituales en niños pequeños son tos no productiva, rinitis y malestar general, pudiendo asociar irritabilidad, rechazo del alimento, vómitos, letargia, dificultad respiratoria, disnea y apneas.

También puede presentarse como una infección respiratoria de vías altas afebril en los menores de 2 años de edad, croup, bronquitis o bronquiolitis (indistinguibles del cuadro clínico ocasionado por el virus respiratorio sincitial o los virus parainfluenza) y en otras ocasiones puede debutar como una convulsión febril. Todos estos síntomas son inespecíficos y pueden ser atribuidos a otras enfermedades si no se realiza un diagnóstico definitivo de infección por virus influenza, lo que a menudo infraestima la importancia de la gripe en los lactantes^{57,58,59}.

Un estudio reciente llevado a cabo en España por nuestro grupo, ha puesto de manifiesto que la infección por virus influenza es una causa importante de patología respiratoria en lactantes y que es responsable de infecciones severas, puesto que comporta el 4,1% de los ingresos por patología respiratoria⁶⁰. Nuestro grupo también ha observado que las infecciones por el virus influenza C, relacionadas en adultos con cuadros respiratorios muy leves, pueden asociarse en lactantes con bronquiolitis o sibilancias recurrentes, lo suficientemente graves como para requerir ingreso hospitalario⁶¹.

La infección por virus influenza en adultos y adolescentes se presenta habitualmente con un inicio brusco de fiebre elevada y escalofríos, cefalea, mialgias, dolor de garganta, tos seca y malestar general. La fiebre puede durar de 1 a 5 días.

Las complicaciones de las infecciones por virus influenza incluyen la otitis media aguda, que se puede observar en un 25% de los casos, la agudización de la patología de base del niño, como es el caso del asma, de la displasia broncopulmonar o de la fibrosis quística. También es frecuente la neumonía viral o bacteriana secundaria, siendo el *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Stafilococcus aureus* los gérmenes más frecuentemente identificados^{62,63,64}.

Otras complicaciones menos frecuentes son la encefalitis, el síndrome de Reye, el síndrome de Guillain-Barré, la mielitis transversa y la miositis, entre otras.

1.3. ADENOVIRIDAE

1.3.1. Adenovirus

Los adenovirus fueron descubiertos en 1953 por Rowe et al⁶⁵, al observar la aparición de un fenómeno degenerativo característico, en el tejido adenoide extirpado quirúrgicamente y cultivado durante varias semanas. En este tejido se aisló un agente viral, que fue denominado adenovirus para hacer referencia a su origen. En los años siguientes se aislaron distintos serotipos de adenovirus en tejido adenoide, así como en secreciones respiratorias de adultos jóvenes con infección respiratoria aguda, en los ojos de pacientes con conjuntivitis, etc., hasta llegar a los 51 serotipos descritos en la actualidad⁶⁶.

Los adenovirus son una causa importante de enfermedad respiratoria aguda en el niño, y se considera que están implicados en el 7-8% de las infecciones respiratorias agudas pediátricas⁶⁷. En España se detectó adenovirus en el 14% de 748 lactantes ingresados por infección respiratoria con algún aislamiento viral positivo⁶⁸.

La familia *Adenoviridae* comprende los géneros *Mastadenovirus* y *Avianadenovirus*, que afectan, respectivamente, a los mamíferos y a las

aves. Se han descrito 51 serotipos distintos en humanos, agrupados en seis subgéneros (de A a F). Recientemente, estudios de epidemiología molecular han permitido clasificar muchos de estos serotipos en distintos genotipos, designados a, b, c, etc. Estos virus poseen DNA como material genético, protegido por una nucleocápside formada por 252 subunidades llamadas capsómeros. De éstos parten unas prolongaciones o fibras, en cuyo extremo se sitúan las glicoproteínas responsables de la adhesión a las células endoteliales de los tejidos⁶⁹. La diferente composición genética de estas fibras virales tiene un importante papel en el tropismo de los adenovirus por los distintos tejidos (Figura 5).

Epidemiología

Las infecciones por adenovirus son ubicuas, pero la importancia de los diferentes serotipos varía geográficamente. Actualmente en Estados Unidos predomina el adenovirus 7b, mientras que el 7c es el serotipo más frecuente en Europa y Australia.

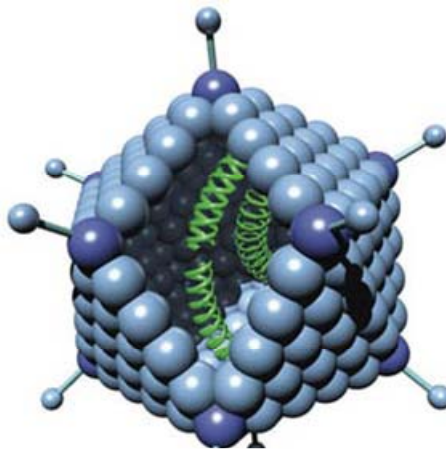


Figura 5 . Estructura de un adenovirus
(Tomado de www.slimfilms.com)

El serotipo causante de la infección y el tipo de enfermedad inducida están estrechamente relacionados con la edad del paciente. Así, los tipos

1, 2, 5 y 6 se aíslan con frecuencia en las amígdalas y adenoides de niños pequeños, pudiendo permanecer latentes en el tejido linfopitelial. En cambio, en los adultos con infección respiratoria, son más frecuentes los tipos 3, 4 y 7. Los tipos 8 y 9 se asocian con infecciones oculares en adultos y los tipos 11 y 21 se han relacionado con infecciones urinarias de vías bajas en niños⁷⁰.

La infección primaria suele ocurrir en los primeros años de la vida y la mayoría de la población ha sido infectada por uno o más serotipos de adenovirus al final de la primera década. La incidencia de infección es máxima entre los 6 meses y los 5 años de edad. Los niños menores de 6 meses suelen estar protegidos por los anticuerpos maternos.

Las infecciones pueden ser endémicas a lo largo de todo el año o aparecer en forma de epidemias. Las epidemias de infección respiratoria por adenovirus son frecuentes durante el invierno, la primavera y el comienzo del verano. Suelen ser prolongadas, con una duración de 1 a 3 años, a diferencia de las epidemias por otros virus respiratorios que suelen estar bien definidas en el tiempo y tener una duración de varios meses⁷¹.

Aunque la mayoría de las infecciones respiratorias suelen ser leves e indistinguibles de las producidas por otros virus, algunos serotipos como el 1-7, 7a, 8, 19, 21 y 35 se asocian con epidemias de considerable morbilidad.

Manifestaciones clínicas

Clínicamente se distingue del resto de los virus respiratorios en que puede afectar a múltiples órganos distintos del aparato respiratorio, dando lugar a conjuntivitis, gastroenteritis, hepatitis, miocarditis, cistitis hemorrágica aguda, invaginación y meningoencefalitis. El hígado, el bazo, el páncreas, el riñón o el corazón pueden verse afectados tanto en personas sanas como en inmunodeprimidos^{72,73}. En algunas series, más del 50% de los niños con infección de vías respiratorias inferiores por

adenovirus tipo 7 presentan hepatomegalia o elevación de las enzimas hepáticas.

Las infecciones por adenovirus en niños inmunocompetentes suelen ser leves y autolimitadas. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son conjuntivitis, infecciones respiratorias de vías altas o faringitis, aunque hasta el 7% de las neumonías que requieren ingreso han sido atribuidas a adenovirus.

Los adenovirus tienen un papel cada vez más relevante en pacientes inmunodeprimidos, concretamente en los enfermos con trasplante de médula ósea. En ellos, el riesgo de adquirir una infección grave se relaciona con la edad (más en niños que en adultos), con el tipo de tratamiento inmunosupresor (globulina antitimocito y anticuerpos monoclonales anti CD52), con la recuperación tardía de la inmunidad tras el trasplante, con la enfermedad injerto contra huésped y con el grado de discrepancia genética entre el donante y el receptor. Otros factores de alto riesgo para enfermedad grave por adenovirus incluyen los linfomas, el tratamiento con alemtuzumab y los trasplantes de órgano sólido (hígado y pulmón). En estos pacientes las infecciones graves por adenovirus incluyen hepatitis fulminante, neumonía y/o encefalitis. También son frecuentes las gastroenteritis y las cistitis hemorrágicas^{73,74}.

Síndromes clínicos asociados a infección por adenovirus

Infección respiratoria

Al menos el 50% de las infecciones por adenovirus en la población general, en épocas no epidémicas, son asintomáticas. La gravedad de las infecciones respiratorias por adenovirus varía de acuerdo con la edad, el serotipo, el *status* socioeconómico y algunos factores ambientales⁷⁵.

La afectación clínica suele traducirse en faringitis o traqueítis leves, aunque los serotipos 3 y 7 pueden originar bronquiolitis o neumonías muy graves. Ambos serotipos se asocian con frecuencia con consolidación

neumónica y/o derrame pleural⁷⁶. Algunos autores han implicado al adenovirus como causa de tos ferina, ya que es el patógeno no bacteriano que con mayor frecuencia se aísla en niños con síndrome pertusoide. Sin embargo, aún no está completamente establecido si existe una relación causal o si se trata de infecciones mixtas bacterianas y virales⁷⁷.

También se ha descrito neumonía intersticial o atípica en las infecciones por adenovirus tipos 4 y 7, con hallazgos clínicos y radiológicos similares a las producidas por *Mycoplasma pneumoniae*, virus influenza o parainfluenza.

La mayoría de los pacientes se recuperan totalmente tras una infección del tracto respiratorio inferior por adenovirus, pero las infecciones graves, sobre todo las asociadas a los serotipos 3, 7 y 21, pueden conllevar secuelas importantes como bronquiolitis obliterante, bronquiectasias, síndrome del pulmón hiperclaro unilateral, colapso pulmonar persistente y alteraciones en las pruebas de función pulmonar⁷⁸. Pueden aparecer bronquiectasias hasta en el 25% de los niños con una neumonía por adenovirus. En algunos estudios se observan bronquiectasias o cambios pulmonares residuales en más de la mitad de los pacientes que sufrieron diez años antes una infección por adenovirus tipo 7, que parece ser uno de los serotipos más agresivos a nivel pulmonar.

Fiebre faringoconjuntival

Es la afectación clínica por adenovirus mejor descrita en los niños. Aparece en pequeños brotes sobre todo en los meses de verano y se caracteriza por conjuntivitis, faringitis, rinitis, adenitis cervical y fiebre. El comienzo es agudo y la duración de 3 a 5 días. Típicamente la conjuntiva tiene un aspecto granular y la afectación respiratoria no suele extenderse a los bronquios ni a los pulmones. Se ha implicado fundamentalmente al serotipo 3 y se cree que las piscinas pueden jugar un papel importante en la propagación de la infección⁷⁹.

Queratoconjuntivitis epidémica

La queratoconjuntivitis por adenovirus suele aparecer de forma epidémica en adultos infectados por los serotipos 8, 19 ó 37. Puede deberse a transmisión nosocomial en las consultas de Oftalmología, al uso de soluciones oftálmicas contaminadas para lentes de contacto o a transmisión viral a través de las manos o fómites. Recientemente se ha descrito en España la infección nosocomial de 43 trabajadores en un hospital a partir de dos recién nacidos ingresados en una Unidad Neonatal⁸⁰.

El período de incubación puede ser de 4 a 24 días y la conjuntivitis puede durar varias semanas. Es frecuente la aparición de adenopatías preauriculares.

Otras manifestaciones

Los adenovirus están implicados además en la aparición de infecciones no respiratorias, como la cistitis hemorrágica, la gastroenteritis, las infecciones del sistema nervioso central e incluso en enfermedades que en principio no se consideran infecciosas como la invaginación intestinal⁸¹.

1.4. CORONAVIRIDAE

1.4.1. Coronavirus

La primera descripción de una enfermedad relacionada con los coronavirus fue publicada en 1.931 cuando Schalk y Hawn describieron una enfermedad respiratoria de los pájaros causada por un agente identificado más tarde por Beaudette y Hudson en 1.937, denominado virus de la bronquitis infecciosa aviar. Más tarde, en el año 1.965 se describió un nuevo agente viral en un niño con una infección respiratoria de vías altas, que tenía gran similitud con el virus de la bronquitis

infecciosa aviar⁸². Este virus fue denominado finalmente OC43. Al mismo tiempo, Hamre y Procknow fueron capaces de conseguir el crecimiento de un nuevo virus, denominado 229E, en cultivo celular de muestras obtenidas de estudiantes de Medicina con resfriados⁸³. Ambos virus compartían propiedades similares, tenían una morfología muy parecida al microscopio electrónico y no pertenecían a ningún grupo de los virus conocidos.

En el año 1.975 estos virus fueron aceptados como un nuevo género denominado *Coronavirus* (HCoV), familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales*. Son partículas pleomórficas de 80-160 nm, envueltos con proyecciones superficiales en forma de pétalo que le dan el aspecto de una corona solar (Figura 6).

Los HCoV poseen el mayor genoma viral de los virus RNA y se replican en el citoplasma de las células infectadas. Tienen una gran facilidad para mutar e incluso, si dos virus distintos infectan la misma célula simultáneamente, son capaces de recombinarse genéticamente⁸⁴. Los HCoV crecen mal en los cultivos celulares, por lo que la mayoría de los estudios epidemiológicos, basados en el diagnóstico serológico, han infraestimado su importancia en las infecciones respiratorias⁸⁵.

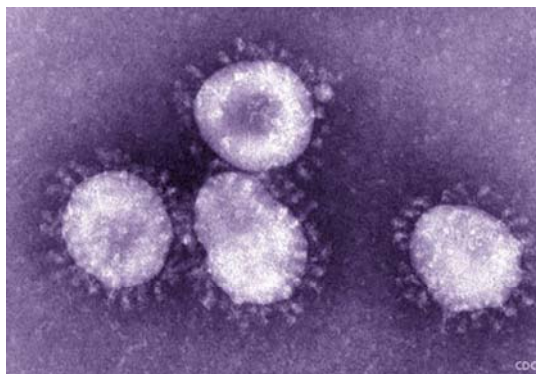


Figura 6. Partículas de coronavirus

(Tomado de http://blog.lib.umn.edu/govref/fdlp100/federal_agencies/)

Los HCoV se clasifican en tres géneros en función de sus características genéticas y antigénicas:

- Grupo I: incluye HCoV-229E y otros virus animales
- Grupo II: incluye HCoV- OC43 y otros virus animales
- Grupo III: incluye únicamente patógenos aviares

Clásicamente se pensaba que los HCoV eran poco frecuentes y que se asociaban fundamentalmente con enfermedades leves. Hasta hace poco tiempo, sólo se conocían 3 coronavirus patógenos para el hombre: los ya mencionados HCoV-OC43 y HCoV-229E, y el causante del SARS, CoV-SARS. Sin embargo, desde el año 2.003 se han descubierto 3 nuevos HCoV, que demuestran que estos virus son mucho más frecuentes de lo que se creía y que no siempre se asocian con infecciones leves. El primero de ellos fue descubierto en 2.004 por van der Loek et al y se ha descrito después en niños con infecciones respiratorias^{7,86,87}. Mediante técnicas de amplificación genómica se secuenció el genoma viral, pudiendo comprobar que era un coronavirus del grupo I, al que denominaron HCoV-NL63.

En el año 2.005 se detectó un nuevo coronavirus, esta vez del grupo II, en una anciana china, procedente de una zona con alta incidencia de SARS. Este nuevo virus, HKU1, era genéticamente distinto del OC43, el otro HCoV humano del grupo II. Estudios seroepidemiológicos posteriores han mostrado que la infección por HCoV-NKU1 es muy común⁸.

Epidemiología

Varios estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos, mostraron que los coronavirus OC43 y 229E causan numerosas infecciones respiratorias, con un pico de máxima incidencia en los últimos meses de invierno y primeros de la primavera. Ambos son responsables de al menos el 15% de las infecciones respiratorias de vías altas, aunque dependiendo de la distribución anual, este porcentaje puede oscilar entre

un 1% y 35%. Las reinfecciones son comunes, sobre todo en los niños. El tipo de coronavirus predominante cambia cada 2-3 años⁸⁸.

Tras la descripción de los nuevos coronavirus, varios grupos han publicado series en diferentes países, mostrando que están distribuidos por todo el mundo^{89,90,91}. El virus HCoV-NL63 se ha detectado fundamentalmente en los meses de enero a marzo, aunque es posible que circule durante todo el año, ya que también se ha aislado en verano. Se ha identificado en el 1-10% de las infecciones respiratorias de los niños. Son frecuentes las coinfecciones con otros virus respiratorios, sobre todo con VRS⁹². No se dispone de datos acerca su frecuencia en niños asintomáticos.

Con respecto al virus HCoV-HKU1, se ha detectado en un pequeño porcentaje de individuos con infección respiratoria fundamentalmente durante los meses de invierno. La mayor parte de los pacientes infectados son niños⁹³.

Manifestaciones clínicas

Los HCoV OC43 y 229E constituyen los agentes del resfriado común. Se ha descrito que su período de incubación es de 2 a 5 días y por lo general los síntomas desaparecen a la semana. Suelen asociarse con infecciones de vías respiratorias altas, con intensa rinorrea, aunque ocasionalmente se han asociado con neumonías en el recién nacido, en el niño mayor, en inmunodeprimidos y en reclutas.

La prevalencia y la morbilidad de las infecciones por HCoV-NL63 y HCoV-NKU1 no están bien caracterizadas. Probablemente, en pacientes sanos se asocian con infecciones respiratorias leves, de una forma similar a los coronavirus clásicos. Sin embargo, en niños, ancianos e inmunodeprimidos, pueden causar cuadros clínicos graves e incluso mortales. Según datos preliminares, los niños menores de 12 meses y los que tienen enfermedades crónicas, son los de mayor riesgo de infecciones severas por HCoV-NL63. El posible papel protector de los

anticuerpos maternos no está totalmente aclarado, ya que se han detectado infecciones graves por este virus en niños menores de 2 meses.

En los niños hospitalizados por infección por HCoV-NL63, predomina el diagnóstico de bronquiolitis. En cambio, en un estudio poblacional, prospectivo, llevado a cabo en Alemania, el 45% de los niños infectados por HCoV-NL63, no hospitalizados, presentaban laringotraqueobronquitis, observándose en ellos un riesgo 6,6 veces mayor de laringotraqueobronquitis que en el grupo control⁹⁴. En este estudio, HCoV-NL63 fue incluso más frecuente que el virus parainfluenza en la etiología del croup. También se ha detectado HCoV-NL63 en niños con infecciones respiratorias de vías altas.

Muy interesante es el hallazgo de HCoV-NL en niños con enfermedad de Kawasaki con una frecuencia significativamente mayor a la de los controles sanos⁹⁵. Esta vasculitis, de origen desconocido a veces se presenta de forma epidémica y con frecuencia está precedida por una infección respiratoria. Se necesitan nuevos estudios, incluyendo técnicas serológicas, para confirmar esta relación.

Con respecto a las infecciones por HCoV-HKU1, los primeros casos descritos en la literatura correspondían a ancianos con enfermedades cardiovasculares o pulmonares subyacentes, con alta mortalidad. En la mayoría de las series pediátricas una proporción importante de pacientes también tenían patología de base. Los síntomas respiratorios asociados con este virus incluyen rinitis, tos, fiebre y sibilancias. Los diagnósticos en los niños ingresados suelen ser infección respiratoria de vías altas, bronquiolitis, neumonía y crisis asmática, aunque algunos autores, que han detectado el virus en heces de niños con síntomas respiratorios y entéricos, sugieren que HCoV-NKU1 también se asocia con síntomas gastrointestinales. Un gran estudio llevado a cabo en Hong Kong ha demostrado una clara asociación entre infección por HCoV-NKU1 y convulsiones febriles.

2. INFECCIONES RESPIRATORIAS POR VIRUS RESPIRATORIOS EMERGENTES

2.1. Metapneumovirus humano

En el año 2.001 van de Hoogen et al informaron del descubrimiento de un nuevo patógeno respiratorio. Este grupo holandés aisló un virus no identificado previamente, en muestras respiratorias de 28 niños, recogidas a lo largo de 20 años durante los meses de invierno. Todos presentaban síntomas de infección respiratoria y 27 de los 28 eran menores de 5 años. La identidad de este nuevo agente era desconocida, pero el hallazgo de filamentos similares a partículas virales en la microscopia electrónica, sugería que se trataba de un virus (Figura 7). Este agente era capaz de producir infecciones respiratorias en animales de experimentación y podía ser recuperado de los mismos. Sin embargo, las técnicas de inmunofluorescencia y PCR frente a virus respiratorios conocidos, incluidos los coronavirus, no conseguían identificarle. Finalmente los investigadores holandeses aplicando una técnica denominada RAP-PCR (random arbitrarily primer PCR) consiguieron identificar una única secuencia genética. Recientemente se ha publicado la secuencia genómica completa de este virus denominado metapneumovirus humano (hMPV). Estos hallazgos han permitido saber que se trata de un virus RNA, perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*.

El primer metapneumovirus descubierto fue el pneumovirus aviar, del que se conocen cuatro genotipos. De ellos, el serotipo C es el que guarda mayor similitud genómica con el hMPV. Sin embargo, a diferencia de aquél, el hMPV no tiene capacidad de infectar a las aves. El genoma de hMPV consiste en una única cadena de RNA de aproximadamente 13 Kb, con 8 genes que codifican para 9 proteínas diferentes.

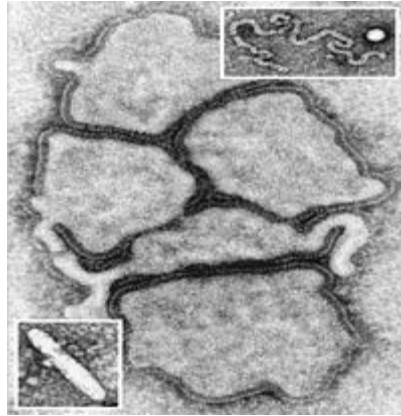


Fig. 7. Micrografía del metapneunovirus humano.

(Tomado de Ref. 5)

El virus hMPV puede ser clasificado en 2 grupos mayores, A y B y en al menos 4 subgrupos según el análisis de la secuencia de las proteínas de los distintos genes⁹⁶. Sin embargo, se necesitan nuevas investigaciones para determinar si estos genotipos representan diferentes grupos antigénicos. La identidad de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos entre los miembros de los dos grupos de hMPV es del 80% y 90% respectivamente, localizándose la mayor variabilidad en los genes G y SH.

Epidemiología

A pesar de que se conoce la existencia del hMPV desde hace tan sólo unos años, se ha demostrado que no es un virus nuevo, sino que ha circulado durante décadas, como lo demuestra el hallazgo de una seroprevalencia del 100% en 72 muestras de suero obtenidas en el año 1958. Varias razones pueden explicar el hecho de que, a pesar de ello, no haya sido identificado hasta ahora. Por un lado, el virus tiene un crecimiento muy lento y escaso en las líneas estándar de cultivos celulares; por otro, requiere tripsina para su propagación *in vitro* y este reactante no suele ser añadido a los medios de cultivo habituales.

Los datos de seroprevalencia publicados hasta ahora, indican también que entre los 6 y 12 meses de vida, el 25% de los niños tienen

anticuerpos frente a hMPV y a la edad de 5-10 años, prácticamente todos los niños se han infectado por hMPV.

Según los resultados de las primeras series de hMPV descritas hasta el comienzo del presente estudio, este virus parece tener una distribución estacional, habiéndose descrito la mayoría de los casos en invierno y primeros meses de la primavera^{5,97,98}. En los países subtropicales, la actividad viral puede diferir, alcanzando el pico de máxima incidencia en primavera y primeros meses de verano⁹⁹.

Manifestaciones clínicas

La serie inicial de pacientes infectados por hMPV, descrita por van den Hoogen et al, estaba compuesta fundamentalmente por niños. El 50% de ellos era menor de 12 meses y el 46% tenía entre 1 y 5 años. Los síntomas que los autores observaron en estos pacientes recordaban al espectro de manifestaciones clínicas del VRS: desde infecciones respiratorias de vías altas, hasta bronquiolitis o neumonía. Poco después se describieron pequeñas series de pacientes en Canadá, Hong Kong⁹⁹ y Europa^{98,100}. Todas ellas coincidían en mostrar al hMPV como un virus asociado a síntomas respiratorios, más graves cuanto menor era la edad del niño infectado. Incluso, según los resultados de la serie francesa, hMPV podría ser uno de los virus más frecuentemente implicados en la bronquiolitis del lactante.

A partir de estos datos no se podía concluir con seguridad que hMPV fuera la causa de estas infecciones. Sin embargo, teniendo en cuenta que ningún otro virus fue detectado en esas 28 muestras respiratorias iniciales y que la existencia de portadores asintomáticos parece ser rara en niños, como lo demuestra la ausencia de hMPV en 400 muestras recogidas en niños sin síntomas respiratorios, parece probable que pueda existir una relación causal.

A partir de la publicación del descubrimiento de este virus, nuestro grupo puso en marcha varios estudios para conocer la prevalencia y las

características clínico-epidemiológicas de las infecciones por hMPV en España. Dichos estudios constituyen una parte de esta Tesis y se expondrán en la sección correspondiente de resultados.

2.2. Bocavirus humano

En el año 2005 Allander et al publicaron el descubrimiento de un nuevo parvovirus humano, aislado de muestras respiratorias obtenidas de niños con infecciones del tracto respiratorio. La técnica empleada para identificar este nuevo patógeno estaba basada en la amplificación no específica de secuencias genómicas virales y representa un poderoso método para identificar virus previamente no conocidos. Los análisis filogenéticos de este nuevo virus mostraron que es un parvovirus y que está estrechamente relacionado con los únicos dos miembros del género *Bocavirus*, un parvovirus bovino y canino, de cuyas dos primeras sílabas ha tomado el nombre. Finalmente, HBoV fue incluido en el género *Bocavirus*, subfamilia *Parvovirinae*, familia *Parvoviridae*.

Los parvovirus son virus DNA de tamaño muy pequeño. La familia *Parvoviridae* contiene dos subfamilias: subfamilia *Densoviridae*, que infecta a los insectos y subfamilia *Parvovirinae* que infecta a los vertebrados. Dentro de la subfamilia *Parvovirinae* se encuentran los siguientes géneros (International Committee on taxonomy of viruses. Virus index database. Available at: <http://www.danforthcenter.otg/iltab/ictvnet/asp/iVirusIndex.asp>. Accessed 20 November 2007):

- Género *Erythrovirus* (que contiene al Parvovirus B 19, causante de la Quinta enfermedad y del que se pensaba que era el único parvovirus patógeno para el ser humano)
- Género *Dependovirus*
- Género *Bocavirus*

Epidemiología

En la serie sueca inicial, HBoV fue detectado retrospectivamente en 17 de 540 (3.1%) niños ingresados por infección respiratoria. En 14 de ellos HBoV fue el único agente identificado, mientras que en 3 (17,6%) se detectó la presencia simultánea de otro virus respiratorio. La mayoría de los casos se detectaron en los meses de invierno. Poco después, otros investigadores en Australia estudiaron, también retrospectivamente, la presencia de este virus en 324 muestras procedentes de adultos y niños con infecciones respiratorias recogidas durante los meses de invierno. Identificaron 17 muestras positivas para HBoV, lo que suponía una incidencia de 5,6% del total y un 13,5% de las muestras positivas. Todas las muestras procedían de niños menores de 3 años. Con estas cifras, HBoV se posicionaba como el segundo virus más frecuente después del VRS. En el estudio australiano la incidencia de coinfecciones fue sorprendentemente elevada, ya que en el 55,6% de las muestras positivas para HBoV se detectaba, al menos, otro virus respiratorio. Las coinfecciones más frecuentes eran con VRS, adenovirus y hMPV.

Parece, a la luz de los primeros estudios, que HBoV circula con un predominio claro en los meses de otoño y comienzos del invierno y que, son los niños de entre 6 meses y 2 años, los de mayor riesgo de sufrir infecciones por este virus^{9,90}.

Manifestaciones clínicas

Los dos primeros estudios en los que se comunicó la existencia de HBoV, tienen un diseño retrospectivo en cuanto a la obtención de la información clínica, y aportan muy pocos datos a este respecto. No obstante, sí parece claro que la afectación clínica significativa es mucho más frecuente en los niños menores de 5 años y que los síntomas son fundamentalmente respiratorios, incluyendo rinorrea, fiebre, tos y sibilancias, habiéndose diagnosticado algunos niños de bronquiolitis y neumonía.

Sin embargo, el papel causal de HBoV tampoco está totalmente aclarado, dado el elevado porcentaje de casos en los que HBoV se detecta simultáneamente con otro virus respiratorio. Por este motivo existen dudas acerca de si HBoV juega un papel patogénico en estos procesos o si actúa más bien como un mero espectador.

Del mismo modo que se ha comentado anteriormente para hMPV, una vez conocida la existencia de este nuevo virus, nuestro grupo comenzó a investigar la circulación de HBoV en España y su comportamiento desde un punto de vista clínico y epidemiológico. Estos estudios, incluidos en esta Tesis, serán también expuestos en la sección correspondiente.

2.3. Rinovirus

Los rinovirus humanos constituyen un género incluido en una gran familia denominada *Picornaviridae*, en la que también están incluidos los enterovirus, hepatovirus, kobuvirus y panechovirus, con capacidad para infectar al hombre. Tradicionalmente los rinovirus se han diferenciado de los enterovirus, con los que guarda un gran parecido, por su capacidad para resistir medios ácidos.

La familia de los picornavirus es la fuente más común de infecciones virales humanas¹⁰¹. Denominados picornavirus por su pequeño tamaño (aproximadamente 30 nm) y por su genoma ARN, están compuestos simplemente por una cápside y una única cadena de ARN. La cápside contiene 4 proteínas dispuestas en 60 unidades protoméricas, formando un icosaedro (Figura 8). Son ubicuos e incluyen rinovirus, enterovirus y hepatovirus¹⁰². Las variaciones en las proteínas de la cápside, que contiene el genoma viral, dan lugar a más de 100 serotipos distintos de rinovirus¹⁰³.

Más del 90% de los serotipos se unen a las células huésped mediante las moléculas de adhesión celular ICAM-1, mientras que sólo algunos serotipos se unen y entran a la célula mediante receptores lipoproteicos de baja densidad¹⁰⁴. El conocimiento actual acerca del posible papel patogénico de los distintos serotipos es muy escaso. La reciente caracterización sistemática de todos los serotipos de rinovirus, llevada a cabo recientemente, permitirá en un futuro próximo la realización de estudios epidemiológicos moleculares¹⁰⁵.

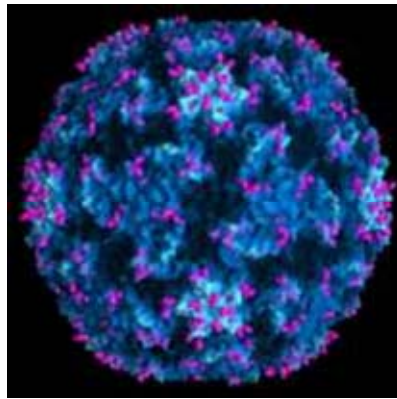


Figura 8. Rinovirus

(Tomado de: www.virology.net/Big_Virology/BVRNAPicorna.html)

La temperatura óptima de crecimiento del rinovirus es relativamente baja, de unos 33°C y se piensa que ha sido el resultado de un proceso de adaptación a su hábitat más frecuente en la nasofaringe. A pesar de ello, al menos algunos serotipos son capaces de crecer con temperaturas mayores¹⁰⁶.

Tras su identificación en cultivo celular en los años cincuenta, numerosos estudios han relacionado a los rinovirus con el catarro común de los niños mayores y de los adultos. El impacto real asociado a las infecciones por rinovirus ha sido infraestimado, porque se pensaba que en personas sanas únicamente producía infecciones leves y autolimitadas y porque el diagnóstico específico era tedioso y caro¹⁰⁷. Sin embargo,

desde los años noventa, gracias a la introducción de la PCR en el diagnóstico de las infecciones respiratorias, está cambiando la imagen previa del rinovirus como virus con poca relevancia clínica. Parece por el contrario, que el rinovirus es un virus frecuente que puede infectar la vía aérea inferior de personas sanas, sin patología subyacente como asma o fibrosis quística.

Epidemiología

Las infecciones por rinovirus son muy frecuentes en todo el mundo. En los países con clima templado circula a lo largo de todo el año, aunque con dos picos de máxima incidencia en abril-mayo y septiembre¹⁰⁸. La enorme diversidad genética de los distintos serotipos hace muy complejo el estudio de la epidemiología molecular de este virus. Parece que varios serotipos pueden cocircular simultáneamente en la misma área geográfica durante una estación epidémica .

La cantidad de virus necesaria para adquirir la infección es extremadamente pequeña y aunque los síntomas clínicos derivados de ella se resuelvan en unos días, es frecuente que la excreción viral persista hasta 3 semanas. Se cree que el rinovirus no entra en el torrente circulatorio de forma habitual y sólo se ha descrito viremia en algunos casos de pacientes inmunodeprimidos.

Manifestaciones clínicas

Está claramente establecido que los rinovirus son, en niños mayores y adultos, la causa más frecuente de catarro común, y ocasionan un cuadro clínico indistinguible del causado por otros virus respiratorios. Tras un periodo de incubación de 1 a 4 días, comienzan los síntomas de una infección respiratoria de vías altas, con rinorrea, tos, estornudos y mayor o menor grado de fiebre. El tiempo de recuperación es variable pero puede llegar hasta dos semanas.

La mayoría de los pacientes con una infección respiratoria de vías altas por rinovirus muestran alteraciones radiológicas en los senos paranasales, que suelen resolverse sin antibióticos en unas semanas en la mayoría de los casos. Sin embargo, un porcentaje de estos pacientes termina desarrollando rinosinusitis bacterianas¹⁰⁹.

La otitis media es la complicación más frecuente de las infecciones por rinovirus en los niños. Más del 40% de las nasofaringitis por rinovirus se asocian con otitis en niños pequeños. Incluso se ha detectado RNA de rinovirus en secreción ótica procedente de niños sin rinovirus en el aspirado nasofaríngeo¹¹⁰. En los últimos años se han publicado varios estudios que relacionan al rinovirus con infecciones de vías aéreas inferiores, bronquiolitis, neumonías y exacerbaciones de asma en lactantes y niños pequeños^{111,112}. También novedosos y sorprendentes son los datos que apuntan a una posible asociación entre bronquiolitis por rinovirus y desarrollo de episodios obstructivos de la vía aérea¹¹³.

Nuestro grupo, tras la implantación rutinaria de la PCR en el diagnóstico virológico de las infecciones respiratorias, puso en marcha un estudio para valorar la importancia cuantitativa y cualitativa del rinovirus en las infecciones respiratorias graves de los niños hospitalizados, que también es objeto de esta Tesis, y cuyos resultados se expondrán en la sección correspondiente.

3. CONSIDERACIONES GENERALES DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS VIRALES

A continuación se resumen las técnicas de laboratorio más utilizadas en el diagnóstico de la infección por virus respiratorios y algunos aspectos prácticos.

3.1. Las muestras clínicas en el diagnóstico de la infección vírica respiratoria

Las muestras adecuadas para el diagnóstico de las infecciones respiratorias virales de origen respiratorio son el frotis nasal, el lavado nasal, el frotis faríngeo y el aspirado nasofaríngeo. Todas ellas obtenidas preferiblemente en los tres primeros días después del inicio de los síntomas, dado que posteriormente la cantidad de virus presente en las secreciones del tracto respiratorio superior disminuye significativamente y dificulta su detección, incluso con las técnicas más sensibles.

Para obtener los exudados es recomendable que los hisopos utilizados sean de poliéster o cualquier otro material sintético, nunca de algodón o alginato de calcio, que pueden contener sustancias que inhiban la amplificación genómica o PCR. También deben evitarse los hisopos con vástagos de madera. Si la situación clínica del paciente lo requiere, además son útiles las muestras invasivas como el lavado broncoalveolar, el aspirado bronquial, el aspirado traqueal y el material de biopsias.

Las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de las muestras son fundamentales para asegurar una buena calidad en la fase preanalítica. En el momento de la recogida de la muestra por parte del personal médico, de enfermería o técnico, es preciso identificarla con el nombre del paciente, origen de la muestra y fecha de la toma. Debido a la

labilidad de los virus implicados en la infección respiratoria, el transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse de forma inmediata tras su recogida o, en su defecto, deben ser refrigeradas a 4 °C hasta un máximo de 48 h. Una vez llegada la muestra al laboratorio, si el procesamiento no va a efectuarse de forma rápida, el almacenaje de la alícuota destinada para realizar técnicas de biología molecular debe realizarse preferiblemente a – 80°C.

3.2. Métodos de diagnóstico directos

Aislamiento viral en cultivo celular

El diagnóstico de las infecciones virales respiratorias se ha basado tradicionalmente en la técnica del cultivo celular a partir de secreciones nasofaríngeas. La elección de las líneas celulares que se emplearán, se realiza en función de su sensibilidad para recuperar los diferentes virus en los que se centre el interés del investigador. El crecimiento viral se detecta por la aparición de un efecto citopático (EC) en la monocapa celular tras diferentes días post-inoculación, dependiendo del virus presente en la muestra. En la Tabla 1 se muestran las líneas celulares generalmente más utilizadas para el aislamiento de los diferentes virus respiratorios, aunque algunos de ellos pueden ser aislados también en otras líneas adicionales. Además, el virus de la gripe puede aislarse por inoculación en huevos de gallina embrionados.

Sin embargo, el cultivo es generalmente lento, necesitando entre 5 y 7 días, y su sensibilidad puede verse afectada por la labilidad de algunos virus, puesto que la integridad de éstos y la cantidad de células intactas presentes en las muestras son factores limitantes para el buen desarrollo de este método diagnóstico. Por otro lado, no siempre resulta fácil el aislamiento de los organismos para su cultivo, porque no se ha localizado la línea celular adecuada (como ocurre con HBoV y algunos coronavirus), o porque se parte de bajos niveles virales en la muestra.

Tabla 1. Líneas celulares principalmente utilizadas para el aislamiento de diferentes virus respiratorios

Virus	Línea celular
Gripe	MDCK
Parainfluenza	LLC-MK2, Hep-2
Rinovirus	MRC-5
Adenovirus	Hep-2, A-549
Coronavirus	
HCoV-OC43	-
HCoV-229E	MRC-5
HCoV-NL63	LLC-MK2
HCoV-SARS	Vero E6
Metaneumovirus	LLC-MK2, Hep-2
Bocavirus	-

MDCK: Riñón canino Madin Darby; LLC-MK2: Riñón de mono rhesus; MRC-5: Fibroblastos de pulmón embrionario humano; Hep-2: Carcinoma epidermoide de laringe humana; Vero E6: Riñón de mono verde africano; A-549: Carcinoma de pulmón embrionario humano.

De modo que, aunque el aislamiento del virus por cultivo sea el *gold estándar* para el diagnóstico de las infecciones virales, su coste, la infraestructura necesaria, el tiempo requerido y la rápida labilidad dependiente del transporte de la muestra, limitan su aplicación en la mayoría de los laboratorios. La utilización de técnicas inmunológicas para la identificación de los virus una vez crecidos en cultivo celular, aumentaría la especificidad de este método diagnóstico.

La técnica de **shell-vial** (SV) también se utiliza para el aislamiento de los virus respiratorios, ofreciendo un diagnóstico seguro en un menor período de tiempo. Brevemente, esta técnica consiste en centrifugar las muestras sobre células en cultivo en tubos especiales (*shell vial*). La centrifugación acelera la adherencia y la penetración del virus a la célula receptora, lo que permite tras uno o dos días de incubación, identificar proteínas del virus mediante anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína. Este método presenta una sensibilidad del 75 a 92% y requiere aproximadamente 48 horas. Puesto que es necesario utilizar diferentes líneas celulares en función del virus que se vaya a aislar, también pueden utilizarse cocultivos de varias líneas para permitir así la detección de diferentes virus en un solo tubo^{114,115}.

Técnicas de diagnóstico rápido por detección de antígeno

Las técnicas rápidas de diagnóstico para el estudio de las infecciones respiratorias agudas (IRA), fueron propuestas por la OMS a partir de 1.981 por considerarlas un método preciso y esencial para el cuidado inmediato del paciente. De esta manera se posibilita la introducción de medidas profilácticas en salud pública, la prevención de la diseminación de los virus en los hospitales y el control en la administración de antibióticos¹¹⁶. En las técnicas rápidas se incluyen la Inmunofluorescencia (IF), la Inmunocromatografía (IC) y el Enzimoimmunoanálisis (EIA). Todas estas técnicas se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a distintos antígenos virales, pudiendo detectarse el virus en un corto periodo de tiempo, incluyendo además aquellos virus no viables presentes

en la muestra, que no serían detectados mediante el aislamiento en cultivo celular. En la Tabla 2 se muestran algunos de los kits comerciales disponibles para el diagnóstico rápido de virus respiratorios.

Tabla 2: Técnicas comerciales para el diagnóstico rápido de virus respiratorios

Kit comercial	Virus diagnosticados	Técnica utilizada
Now Combo Flu A y B	Gripe	IC
Flu-OIA test	Gripe	EIA
Directigen FLU A/B	Gripe	EIA
Cytospin-IFD FLU A	Gripe	IFD
Adenovirus Respiratorio Letitest	Adenovirus	IC

IC: Inmunocromatografía

EIA: Reacción inmunoenzimática

IFD: Inmunofluorescencia directa

Inmunofluorescencia (IF)

Permite la detección del virus mediante anticuerpos monoclonales específicos frente a diferentes antígenos virales. Si los anticuerpos monoclonales van unidos a un fluoróforo, se habla de Inmunofluorescencia directa (IFD). Si se utilizan anticuerpos secundarios unidos a un marcador fluorescente capaces de reconocer los diferentes anticuerpos monoclonales,

se habla de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). En ambos casos, esta técnica permite obtener resultados en el día, aunque se requiere un microscopio de fluorescencia y personal entrenado en la observación de este tipo de preparaciones. Hasta hace unos años esta técnica era utilizada esencialmente para el virus de la gripe y el VRS. Sin embargo, actualmente existen anticuerpos monoclonales comerciales frente a la mayoría de los virus respiratorios conocidos¹¹⁷.

Para poder analizar una muestra por IF, ésta debe contener un número aceptable de células, para lo que es preciso adiestrar convenientemente al personal encargado de su obtención. El lavado nasofaríngeo es superior al simple aspirado, mientras que los frotis faríngeos realizados con una torunda de algodón y remitidos en un medio semisólido, no son buenas muestras para la realización de esta técnica.

Enzimoinmunoanálisis (EIA)

Esta técnica utiliza antígenos o anticuerpos unidos a enzimas sin que ninguno de ellos vea alteradas sus propiedades inmunológicas ni enzimáticas. La actividad del sistema enzimático acoplado al anticuerpo se modifica en función de la reacción frente al antígeno. La variación de esta función enzimática tiene una lectura colorimétrica. Debido a la sensibilidad, alta especificidad, simplicidad y estabilidad de los reactivos utilizados, se han desarrollado numerosas metodologías que permiten determinar antígenos en fluidos biológicos^{118,119}.

Los EIA comerciales se basan en la fijación del anticuerpo a una fase sólida, generalmente placas de microtitulación, y los anticuerpos utilizados para cada virus varían según el fabricante. En la actualidad algunos de estos métodos están perfectamente automatizados, por lo que no se requiere personal tan especializado como para la IF. Hay variantes técnicas, según la firma comercial: EIA de captura, en *sandwich*, competitivo, determinantes de la avidéz, etc. Sin embargo, cada método comercial tiene sus características de sensibilidad y especificidad propias.

Inmunocromatografía (IC)

La IC permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación del oro coloidal en zonas específicas de una membrana, en la que se fijan previamente anticuerpos de captura. Esta técnica se ha desarrollado fundamentalmente para el virus de la gripe¹²⁰ y VRS¹²¹, aunque también se han realizado estudios para otros virus respiratorios como adenovirus^{122,123} y hMPV^{124,125}. Sus principales ventajas son la rapidez y la sencillez.

Al igual que los resultados obtenidos mediante EIA, los obtenidos por IC varían mucho en sensibilidad según el método comercial utilizado y el tipo de muestra analizada.

Detección de ácidos nucleicos

Los métodos moleculares de diagnóstico fundamentados en la detección de ácidos nucleicos están basados en la búsqueda y el reconocimiento del genoma viral en la muestra clínica o en el cultivo viral. Aunque el uso de estas técnicas se está incrementando rápidamente y ha transformado el diagnóstico de determinadas infecciones víricas (hepatitis B, C y VIH), el papel de estos métodos en la rutina diagnóstica de la infección respiratoria viral, es aún escaso y de reciente incorporación. Si bien el cultivo ha sido considerado el método de referencia en el diagnóstico de las viriasis respiratorias, las técnicas de detección de ácidos nucleicos han supuesto una excelente alternativa en los laboratorios en los que el cultivo celular no está disponible. Suponen una ventaja respecto al cultivo en cuanto a mayor sensibilidad, rapidez y a que no es necesaria la presencia de virus viables en la muestra clínica. Es más, en el caso de algunos virus como VPI 4, rinovirus, hMPV, HBoV o algunos coronavirus, en los que el cultivo es difícil

o no se ha conseguido por el momento, la detección de material genómico constituye el método de elección para su diagnóstico.

Hasta el momento la mayoría de las técnicas de detección de ácidos nucleicos empleados en los laboratorios de virología utilizan métodos “caseros”, que suponen un gran esfuerzo en su diseño y optimización. Pese a ello, probablemente estas técnicas de biología molecular son el futuro en cuanto al diagnóstico rutinario de las infecciones respiratorias virales, sobre todo cuando aumente la disponibilidad de equipos comerciales bien evaluados, normalizados y totalmente automatizados.

Para una mejor comprensión podemos dividir los métodos de detección de ácidos nucleicos en técnicas de amplificación genómica y técnicas de hibridación.

Amplificación genómica

La amplificación genómica mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un método que permite amplificar exponencialmente secuencias específicas de ADN, gracias a la acción enzimática de la ADN polimerasa. El procesamiento de una muestra para la amplificación de ácidos nucleicos viene determinado por una serie de etapas:

- Extracción de los ácidos nucleicos
- Retrotranscripción (sólo para virus ARN: RT-PCR)
- Amplificación
- Detección del producto final

La diferencia fundamental entre la PCR convencional y la, cada vez más empleada, *PCR a tiempo real* lo constituye la fase de detección. La detección del material genético en el caso de la PCR a tiempo real se realiza al mismo tiempo que el ácido nucleico diana se va amplificando, mientras

que en la PCR convencional la detección se realiza después de que el paso de amplificación ha finalizado.

Uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional o a tiempo final es que se trata de un método cualitativo, que muchas veces requiere la aplicación de una segunda amplificación: PCR secuencial (PCR anidada o *nested-PCR*), para obtener una sensibilidad similar a la que se alcanza utilizando una PCR a tiempo real, lo que incrementa, no sólo el trabajo y el tiempo necesario hasta la obtención de los resultados, sino también el riesgo de contaminación. La PCR en tiempo real, además de obviar estas dificultades, permite la cuantificación y ya existen publicaciones de diversos protocolos de PCR en tiempo real para casi todos los virus que producen infección respiratoria^{126,127,128,129}.

Por otro lado, la existencia de un elevado número de virus que pueden estar involucrados en la patología respiratoria, no siendo infrecuente la detección de infecciones múltiples, ha hecho necesario el diseño de métodos de PCR múltiple en los que simultáneamente se puedan identificar numerosos virus^{126,130}.

Técnicas de hibridación

Son técnicas que permiten el procesamiento de una elevada cantidad de muestras por cada ensayo: *PCR acoplada a enzimoimmunoanálisis* (PCR-EIA), o bien posibilitan el análisis simultáneo de varios genes pertenecientes a diferentes organismos: *microarrays* o *biochips*. En ambos casos el paso previo es una amplificación del material genético del virus que se quiere investigar, pero se diferencian en la forma de detectar el material genético amplificado.

PCR acoplada a enzimoimmunoanálisis

Consiste en una amplificación cuyos productos se detectan mediante sondas. Las sondas son fragmentos cortos de ADN complementarios y específicos del virus a detectar, que en este caso se encuentran marcadas y

en solución. La unión de la sonda al material genético del virus se detecta mediante una técnica de ELISA, cuyo anticuerpo es reactivo frente al marcador anclado en la sonda. En la actualidad existe una técnica comercializada basada en la PCR-EIA capaz de detectar y diferenciar virus influenza A y B, virus parainfluenza 1, 2, 3 y VRS¹³¹.

Microarrays o biochips de ADN

Se fundamentan en una amplificación y posterior detección con sondas que se encuentran inmovilizadas en una superficie. La aportación más novedosa al diagnóstico de la infección respiratoria está llegando de la mano de los denominados *chips* de ADN en fase líquida. En estos sistemas las sondas se encuentran impresas sobre microesferas en suspensión, mejorándose la accesibilidad de las sondas nucleotídicas e incrementado la sensibilidad de la técnica¹³².

3.3. Métodos indirectos: técnicas serológicas

El diagnóstico serológico de los virus respiratorios necesita generalmente de la extracción de dos muestras de suero, la primera en la fase aguda de la enfermedad y la segunda en la fase de convalecencia. Esto representa una de las mayores dificultades del diagnóstico serológico, ya que muchos de los virus respiratorios además de ser muy prevalentes producen reinfecciones, por lo que el paciente presenta una inmunización previa frente a un determinado virus, que será aumentada por la reinfección. Por tanto, no se podrá demostrar en muchos casos una verdadera seroconversión, ni un aumento de título significativo. Si a esto se añade la baja producción de anticuerpos que desarrollan los neonatos y lactantes, se entiende que las técnicas serológicas tengan un escaso valor en el diagnóstico clínico, aunque sí sean útiles en estudios seroepidemiológicos. En la tabla 3 se indican las características de cada una de las técnicas serológicas que se comentan a continuación.

Tabla 3. Características diferenciales de las técnicas utilizadas en los estudios seroepidemiológicos de la infección respiratoria viral.

	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Fijación del complemento	<ul style="list-style-type: none"> • Permite demostrar la circulación de virus de diferentes tipos (ej. gripe A y gripe B). 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja sensibilidad. • Laborioso • Difícilmente reproducible
Inhibición de la hemaglutinación	<ul style="list-style-type: none"> • Establece la presencia de anticuerpos frente a diferentes tipos e incluso subtipos de virus (ej. gripe A H3N2, gripe A H1N1) 	<ul style="list-style-type: none"> • Falsos (+) por presencia en el suero de reactantes inespecíficos. • Realización e interpretación compleja y subjetiva. • Escasa reproducibilidad entre laboratorios. • Poco sensible.
Inmunofluorescencia indirecta y ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas relativamente sencillas y rápidas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Numerosas reacciones cruzadas entre virus relacionados por los que su aplicación es muy limitada.
Neutralización	<ul style="list-style-type: none"> • Los títulos de los anticuerpos neutralizantes son fiables y representan el estado real de protección. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sólo aplicable a virus respiratorios capaces de crecer en cultivos celulares.

Fijación de complemento

Se basa en el uso del sistema del complemento cuya activación da lugar a una serie de funciones en la respuesta inmunitaria (opsonización, quimiotaxis y anafilaxis). El complemento reacciona frente a complejos antígeno-anticuerpo y cuando se mantiene libre y no se fija a un complejo antígeno-anticuerpo determinado, reaccionará con un marcador de negatividad del ensayo que consiste en eritrocitos de oveja que serán hemolizados. Se utiliza en los laboratorios de referencia para demostrar la presencia de anticuerpos frente a virus de la gripe A, virus de la gripe B, adenovirus, VRS y virus parainfluenza¹³³.

Inhibición de la hemaglutinación

Algunos virus respiratorios (influenza, parainfluenza) presentan como antígenos de superficie proteínas (hemaglutinina) capaces de producir aglutinación de eritrocitos. Basándose en esta propiedad, cuando una muestra es positiva y contiene anticuerpos específicos frente a alguno de estos virus, no se produce la unión entre la hemaglutinina viral y los receptores de los hematíes, inhibiéndose la hemaglutinación de dichos eritrocitos. Esta técnica se utiliza para conocer el estado inmunológico de la población tras la administración anual de las vacunas gripales.

Inmunofluorescencia indirecta y ELISA

Para muchos de los virus respiratorios se han desarrollado sistemas de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la detección de los anticuerpos frente a un determinado virus. En estos ensayos se han utilizado diferentes antígenos virales obtenidos tras el cultivo viral en células o antígenos virales obtenidos mediante recombinación. Los sistemas de análisis de anticuerpos mediante métodos de inmunofluorescencia indirecta consisten en fijar células infectadas por un determinado virus a un porta de cristal y analizar la presencia de anticuerpos en la muestra.

Neutralización

Se basa en la inhibición de la replicación viral mediante anticuerpos específicos del paciente. Se necesitan virus que crezcan en cultivos celulares y que demuestren un efecto citopático claro. Tras un proceso de incubación del suero del paciente con un determinado virus, se inocula en una o varias líneas celulares y se observa la evolución de dichos cultivos. Si existe crecimiento viral, el suero del paciente carecía de anticuerpos.

II.- JUSTIFICACIÓN DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

ORIGEN DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Las infecciones respiratorias son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en Pediatría. Sin embargo, y a pesar de su elevada frecuencia, su etiología sigue siendo una incógnita en una proporción importante de los casos. Esta laguna de conocimiento supone, en no pocas ocasiones, tratamientos antibióticos innecesarios y hospitalizaciones prolongadas. A su vez estas situaciones favorecen el desarrollo de resistencias bacterianas y la adquisición de infecciones nosocomiales, suponiendo un importante coste socio-sanitario.

En los últimos años hemos asistido al desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de diagnóstico virológico, especialmente de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ello ha permitido, por un lado, mejorar el diagnóstico de algunos virus respiratorios clásicos, como el rinovirus, infradiagnosticados por su dificultad para ser detectados con los métodos de detección habituales. Por otro lado, se han descubierto nuevos virus respiratorios, metapneumovirus y bocavirus humano, no conocidos hasta ahora, a pesar de haber circulado entre los seres humanos desde hace muchos años.

Gracias a estos avances tecnológicos, el panorama de las infecciones respiratorias virales está cambiando enormemente, aunque aún existen numerosos interrogantes sin responder, como las relativas al comportamiento clínico y epidemiológico de estos virus respiratorios emergentes e incluso a su verdadero papel patogénico.

Desde hace más de diez años nuestro grupo ha venido trabajando para intentar ampliar el conocimiento de las infecciones respiratorias virales graves en los niños hospitalizados. Para ello se constituyó un grupo multidisciplinar, compuesto por pediatras, virólogos, biólogos y técnicos de laboratorio que, gracias al trabajo en equipo, ha conseguido una rutina de trabajo sistematizada, tanto desde el punto de vista clínico

como virológico. La ayuda proporcionada por varios proyectos del Fondo de Investigaciones Sanitarias, ha contribuido sin duda, al desarrollo de nuestra línea de investigación (Proyecto FIS expediente nº 95/0387. *“Caracterización de la circulación del virus respiratorio sincitial en población infantil hospitalizada de Madrid”*. Proyecto FIS expediente nº: 98/0310: *“Estudio de las infecciones repetidas graves, producidas por el virus respiratorio sincitial y otros virus respiratorios, en los dos primeros años de vida: definición, causas y evolución.”* Proyecto FIS expediente nº: PI060532: *“Infecciones respiratorias agudas asociadas a nuevos virus respiratorios: características virológicas, clínicas y epidemiológicas”*).

El trabajo motivo de esta Tesis fue diseñado para aportar información acerca de la circulación en España de los virus respiratorios emergentes, rinovirus, metapneumovirus y bocavirus así como de su comportamiento clínico-epidemiológico.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El diagnóstico de las infecciones respiratorias virales se basa, en la mayoría de los estudios publicados en la literatura, en la utilización de técnicas basadas en la PCR. A pesar de ello, esta técnica no está implantada de forma rutinaria en la práctica clínica habitual. Por ello, una proporción importante de virus respiratorios, que pueden asociarse con infecciones graves especialmente en niños pequeños, son infradiagnosticadas o no son diagnosticadas en absoluto.

Con la finalidad de mejorar el diagnóstico de las infecciones respiratorias graves en el niño hemos planteado un trabajo clínico y de laboratorio, que amplíe el conocimiento de la etiología, las manifestaciones clínicas y epidemiológicas de los virus respiratorios emergentes en Pediatría. En este trabajo nos hemos propuesto los objetivos que se exponen en el siguiente capítulo.

III.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Ampliar el conocimiento de las infecciones asociadas a los virus respiratorios emergentes, rinovirus, metapneumovirus humano y bocavirus humano en niños.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la frecuencia de las infecciones respiratorias por virus emergentes: hMPV, HBoV y rinovirus, en los niños hospitalizados por infección respiratoria en el Servicio de Pediatría del Hospital Severo Ochoa.

2. Describir las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias por hMPV, HBoV y rinovirus en los niños hospitalizados por infección respiratoria.

3. Comparar las características clínicas de las infecciones simples (no coinfecciones) por hMPV y HBoV con las infecciones simples por el virus respiratorio sincitial.

4. Estudiar la frecuencia de detección de los virus respiratorios emergentes en niños asintomáticos.

5. Evaluar la evolución de los niños ingresados por bronquiolitis por metapneumovirus con la de los niños ingresados por bronquiolitis por virus respiratorio sincitial, y la de un grupo control de niños sin bronquiolitis en los primeros dos años, con respecto al desarrollo de sibilancias recurrentes y/o asma al 3º-5º año de vida.

IV.- PUBLICACIONES

En primer lugar se describirán tres publicaciones relacionadas con el metapneumovirus humano. Las dos primeras están enfocadas en las características de las infecciones respiratorias agudas por metapneumovirus humano, mientras que la última expondrá la relación existente entre bronquiolitis por metapneumovirus y desarrollo posterior de asma.

A continuación, se expondrán cuatro estudios acerca del bocavirus humano, en los que se ha investigado la infección por este virus en niños hospitalizados por infección respiratoria y en niños sanos.

Por último, se describirá una publicación en la que se actualiza el papel del rinovirus en las infecciones respiratorias en lactantes.

PREMIOS, CITAS EN PUBLICACIONES Y CONFERENCIAS

Premios

Los artículos que componen esta Tesis han recibido los siguientes premios:

- Premio a la mejor comunicación oral. XXVII Reunión de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica. Barcelona, 5 a 7 de mayo 2005. *Estudio prospectivo de las infecciones por metapneumovirus humano en menores de 2 años.*
- Premio al mejor póster. III Congreso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. II Reunión Hispano-Mexicana de Infectología Pediátrica. Marzo 2006. *Infecciones respiratorias por bocavirus: un nuevo patógeno en las infecciones infantiles*
- Premio a las tres mejores comunicaciones orales: 55 CONGRESO DE LA A.E.P., Valencia 1 a 3 de junio de 2.006.

- *Prevalencia de las infecciones por metapneumovirus en lactantes hospitalizados.*
- *Infecciones respiratorias por bocavirus: un nuevo agente en la patología infecciosa en niños*
- *Infecciones virales respiratorias múltiples: ¿son diferentes de las simples?*
- Premio al mejor póster. XII Congreso de Neumomadrid. Madrid, 12 y 13 de mayo de 2.007. *Infecciones respiratorias por virus emergentes: metapneumovirus humano y bocavirus.*
- Premio al mejor póster. XXIX Reunión de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica. Bilbao, 3 a 5 de mayo de 2.007. *Rinovirus: de la bronquiolitis al asma.*

Citas

Los artículos motivo de esta Tesis han sido citados en las publicaciones que se enumeran a continuación:

Baer G, Schaad UB, Heininger U

Clinical findings and unusual epidemiologic characteristics of humanmetapneumovirus infections in children in the region of Basel, Switzerland.

EUROPEAN JOURNAL OF PEDIATRICS 2008;167(1):63-9.

Piippo-Savolainen E, Korppi M

Wheezy babies- Wheezy adults? Review on long-term outcome until adulthood after early childhood wheezing.

ACTA PAEDIATRICA, INTERNATIONAL JOURNAL OF PAEDIATRICS 2008;97(1): 5-11.

Reina J, Ferrés F, Mena A, Figuerola J, Alcoceba E

Clinical and epidemiological characteristics of respiratory infections caused by human metapneumovirus in pediatric patients.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
2008;26(2):72-6.

Manoha C, Bour J, Pitoiset C, Darniot M, Aho S, Pothier P

Rapid and sensitive detection of metapneumovirus in clinical specimens by indirect fluorescence assay using a monoclonal antibody.

JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2008;80(1):154-8.

Calvo C, García-García ML, Blanco C, Frías ME, Casas I, Pérez-Breña P.

Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain.

MEDSCAPE WEEK IN REVIEW , Octubre 2.007.

Semple MG, Booth JA, Ebrahimi B

Most human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus in infant nasal secretions is cell free.

JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 2007;40(3):241-4.

Madhi SA, Ludewick H, Kuwanda L, Van Niekerk N, Cutland C, Klugman KP

Seasonality, incidence, and repeat human metapneumovirus lower respiratory tract infections in an area with a high prevalence of human immunodeficiency virus type-1 infection.

PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL 2007;26(8):693-9.

Jofré Morales L, Luchsinger F, Zepeda F, Rojas C, Muñoz A

Apnea as a presenting symptom in human metapneumovirus infection.

REVISTA CHILENA DE INFECTOLOGÍA 2007;24(4):313-8.

De Carvalho WB, Johnston C, Fonseca MC

Acute bronchiolitis, an updated review.

REVISTA DA ASSOCIACAO MEDICA BRASILEIRA 2007;53(2):182-8.

Kotaniemi-Syrjänen A, Korppi M

Respiratory viruses, eosinophil activation, and early allergen sensitization. Early life predictors of persistent wheezing and asthma.

CURRENT PEDIATRIC REVIEWS 2007;3(2):115-127.

Teeratakulpisarn J, Ekalaksananan T, Pientong C, Limwattananon C

Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus detection in young children with acute bronchiolitis.

ASIAN PACIFIC JOURNAL OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY 2007;25:139-145.

Delacourt C

Sequelae of viral lower respiratory tract infections in children.

REVUE DU PRACTICIEN 2007;57(17):1919-22.

Romanic V, Ahel V, Zubovic I, Saina G

Pneumonia in children.

PAEDIATRIA CROATICA 2007;51(1):23-31.

Cubas R, Roque E, Ronco M, Muñoz R, Valenzuela S, Torres N, et al.

Severe respiratory distress associated to metapneumovirus infection in infants.

REVISTA CHILENA DE PEDIATRÍA 2007;78(2):165-8.

Simon A, Wilkesmann A, Müller A, Schildgen O

HMPV infections are frequently accompanied by co-infections.

PEDIATRIC PULMONOLOGY 2007;42(1):98.

Ordás J, Boga JA, Alvarez-Argüelles M, Villa L, Rodríguez-Dehli C, de Oña M, et al.

Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children.

J CLIN MICROBIOL. 2006;44(8):2739-42.

Van Woensel J, Bos A, Lutter R, Rossen J, Schuurman R

Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection.

PEDIATRIC PULMONOLOGY 2006;41(9):872-4.

Kahn JS

Epidemiology of human metapneumovirus.

CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS 2006;19(3):546-57.

Conferencias

He sido invitada a presentar estos trabajos sobre infecciones por virus respiratorios emergentes en distintos foros nacionales:

- Avances en Neumología Pediátrica. Sevilla, 20 y 21 de enero de 2.006. *"Infecciones respiratorias por virus emergentes"*.
- Curso de Actualización de infecciones respiratorias. Alcalá de Henares, 2006." *Infecciones respiratorias"*.
- 54 Congreso de la Asociación Española de Pediatría. Murcia, 2 a 4 de junio de 2.006. *"Infecciones respiratorias por virus emergentes"*.
- III Curso Nacional de Actualización en Neumología Pediátrica. Febrero de 2.007. *"Infecciones respiratorias víricas. Lo que sabemos y lo que no sabíamos"*.

- V Curso de Asma Infantil. Asma: de la teoría a la práctica. Unidad de Neumología Infantil. Hospital Clínico Universitario de Valencia, 9 a 10 de marzo de 2.007. *“De la infección al asma”*.
- XII Congreso de la Sociedad Madrileña de Neumología y Cirugía Torácica (NEUMOMADRID). Madrid 2.007. *“Virus respiratorios emergentes”*.

Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain.

García-García ML, Calvo C, Martín F, Pérez-Breña P, Acosta B, Casas I.

Arch Dis Child 2006;91:290-5.

Archives of Disease in Childhood es el órgano de difusión del *Royal College of Paediatrics and Child Health* Británico y una de las revistas con mayor difusión y prestigio en la Pediatría mundial.

Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain.

García-García ML, Calvo C, Pérez-Breña P, Cea JM, Acosta B, Casas I.

Pediatric Pulmonol 2006;41:863-71.

Pediatric Pulmonology es una de las revistas de mayor prestigio y difusión en la Neumología pediátrica mundial.



Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain

M L García-García, C Calvo, F Martín, P Pérez-Breña, B Acosta and I Casas

Arch. Dis. Child. 2006;91:290-295; originally published online 6 Jan 2006;
doi:10.1136/adc.2005.082388

Updated information and services can be found at:
<http://adc.bmj.com/cgi/content/full/91/4/290>

These include:

References

This article cites 36 articles, 6 of which can be accessed free at:
<http://adc.bmj.com/cgi/content/full/91/4/290#BIBL>

Rapid responses

One rapid response has been posted to this article, which you can access for free at:

<http://adc.bmj.com/cgi/content/full/91/4/290#responses>

You can respond to this article at:

<http://adc.bmj.com/cgi/eletter-submit/91/4/290>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article

Topic collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Other respiratory infections](#) (615 articles)
[Children](#) (1801 articles)

Notes

To order reprints of this article go to:
<http://www.bmjjournals.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *Archives of Disease in Childhood* go to:
<http://www.bmjjournals.com/subscriptions/>

ORIGINAL ARTICLE

Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain

M L García-García, C Calvo, F Martín, P Pérez-Breña, B Acosta, I Casas



Arch Dis Child 2006;91:290–295. doi: 10.1136/adc.2005.082388

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
M Luz García-García,
Servicio de Pediatría,
Hospital Severo Ochoa,
Avenida Orellana s/n
Leganés, 28911, Madrid,
Spain; marialuzgarcia@terra.es

Accepted
13 December 2005
Published Online First
6 January 2006

Background: Human metapneumovirus (hMPV) causes lower respiratory tract infections, particularly in young children and the elderly.

Methods: A prospective study was conducted on the clinical characteristics of infants <2 years of age admitted to hospital for respiratory infection and the characteristics of hMPV infections were compared with those of infections caused by respiratory syncytial virus (RSV). Influenza A, B and C viruses, RSV, parainfluenza viruses, and adenoviruses were simultaneously detected in clinical samples by multiple reverse transcription nested-PCR assay. The presence of hMPV was tested in all samples using two separate RT-PCR tests.

Results: A respiratory virus was detected in 65.9% of the 749 children included in the study. hMPV, found in 69 of the positive nasopharyngeal aspirates (14%), was the most common virus after RSV. Peak incidence was in March and over 80% of children were <12 months of age. The most common diagnoses were recurrent wheezing (49.3%) and bronchiolitis (46.4%). Oxygen therapy was required by 58% of patients, and assisted ventilation by one. Clinical characteristics in the 18 co-infections were indistinguishable from those of single infections. Fifty one hMPV single infections were compared with 88 hRSV single infections. Recurrent wheezing was diagnosed more frequently in hMPV patients. All other variables tested were similar in both groups.

Conclusions: hMPV was the second most frequent virus after RSV in infants <2 years of age hospitalised for respiratory infection and was associated with lower respiratory tract infections. hMPV occurred predominantly in springtime. Co-infections were frequent and clinically similar to single infections and RSV infections.

Human metapneumovirus (hMPV), recently described in the Netherlands,¹ is an RNA virus belonging to the *Paramyxoviridae* family, subfamily *Pneumovirinae*, genus *Metapneumovirus*. Although hMPV was first described only 4 years ago, 100% seroprevalence has been found in samples obtained 50 years ago.¹ It is therefore believed this virus may have been present in humans for over five decades. The difficulties in isolating this type of virus from cell cultures have possibly delayed its detection as a common pathogen in children's respiratory infections. Over the past 4 years, this virus has been identified in patients with respiratory diseases in several countries, including Canada,^{2–3} Finland,⁴ the United Kingdom,⁵ Spain,^{6–7} the United States,^{8–9} and France.¹⁰

hMPV is genetically similar to avian pneumovirus, particularly serotype C. Two main genetic lineages have been identified to date. The phylogenetic studies conducted by the Dutch group¹¹ show a high similarity to respiratory syncytial virus (RSV), with which it shares morphological similarities and similar infective capacity and spectrum of disease. Upper and lower respiratory tract infections, from common colds to pneumonia, are attributed to hMPV, with bronchiolitis being the main clinical sign of primary infection in hospitalised patients.¹⁰

From an epidemiological point of view, hMPV infection shows seasonal behaviour, with a pattern similar to RSV infection, though few prospective studies on its behaviour throughout the whole year are currently available.

We previously reported hMPV infection in 18 infants under the age of 2 admitted to hospital during 2002–2003.⁷ The current objectives were to estimate the relative contribution of hMPV in infants hospitalised for acute respiratory tract infection in Spain, as well as to define the clinical and epidemiological features of hMPV infection as compared with RSV infection over 3 years.

METHODS

Patients and samples

This was a substudy of an ongoing prospective investigation of respiratory tract infections in children under 2 years of age, funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias. The study was conducted at the paediatric department of Severo Ochoa Hospital in Madrid, Spain. We recruited all children under the age of 2 consecutively admitted to our hospital with acute respiratory infections throughout the 2000–2001, 2001–2002, and 2002–2003 epidemiological seasons (from October 2000 to June 2003). Cystic fibrosis was the only criterion for exclusion. All parents were duly advised, upon admission, that clinical data relating to their children might be used for clinical research purposes. Furthermore, in each case, informed verbal consent was obtained from each of the parents or legal guardians. Nasopharyngeal aspirates (NPAs) were taken from each patient upon admission and sent to the Respiratory Virus Laboratory at the National Microbiology Center (ISCIII, Madrid, Spain). Samples were processed within 24 h of collection for virological study. Indirect immunofluorescence assays and multiplex RT-nested-PCR were carried out on every sample for RSV, influenza viruses, parainfluenza viruses, adenoviruses, or enteroviruses.^{12–13} A 200 µl aliquot was taken from each NPA sample (with all the necessary precautions being taken to avoid contamination) and then kept frozen at –70°C until analysis for hMPV.

Amplification of viral nucleic acids for metapneumovirus detection

All samples were investigated for hMPV using specific amplification methods, regardless of the existence of a

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; hMPV, human metapneumovirus; ICU, intensive care unit; NPA, nasopharyngeal aspirate; RSV, respiratory syncytial virus; WBC, white blood cell

previous positive or negative result for other viruses. RT-PCR assays for hMPV were performed as described previously by our group.¹⁴ Briefly, hMPV in respiratory secretions from patients was investigated using two separate RT-PCR assays designed in two different genes, one gene encoding for the matrix protein (M) and the other for the viral polymerase (L), as described elsewhere.¹⁴ Specific primer pairs were designed to amplify highly conserved regions of both M and L genes. Nucleic acids from original samples were extracted as previously described by Casas *et al.*¹⁵

For reverse transcription and PCR amplification of the M gene, a commercial kit (Qiagen OneStep RT-PCR Kit, Qiagen, Valencia, CA) was used. A subsequent half-nested PCR reaction was conducted using a total of 2 µl from the first reaction products, which were then added to the reaction mixture (to a final volume of 50 µl). The amplified products were analysed by gel electrophoresis stained with ethidium bromide and a 687 bp band was obtained.

The polymerase gene fragment was amplified using L6 and L7 oligonucleotides.¹⁶ The L6 oligonucleotide was labelled at the 5' end with biotin to allow for detection of the PCR product by chemoluminescence. The specific probe designed to be used in the reverse line blot hybridisation with the PCR product was 5' end amino-labelled. The Qiagen One Step RT-PCR kit was also used for the RT-PCR reaction. The resulting amplified and labelled DNA was subjected to membrane hybridisation with a specific probe, after which the membrane was washed and finally treated with a streptavidine-peroxidase conjugate (Roche, Indianapolis, IN). The resulting products were detected by chemoluminescence with ECL detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

To check the specificity of the results, amplified products obtained from the positive clinical samples were sequenced in an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the DNA Sequencing Facility, Genomics Unit (National Microbiology Center, ISCIII, Spain).

NPAs were only considered positive for the presence of hMPV when a positive result for this virus was obtained in both assays.

Clinical assessment and statistical analysis

Throughout their hospital stay, a study questionnaire (complete with demographic and clinical data) was kept for all patients. All data (except hMPV results) were collected during the hospital stay: some were obtained at admission (age, gender, sex, month of admission, clinical diagnosis, history of prematurity, and underlying chronic diseases), while the rest were provided when the patient was discharged (need for oxygen therapy evaluated by transcutaneous oxygen saturation, axillary temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$, presence of infiltrate/atelectasis in chest x rays, administration of antibiotic therapy, length of hospital stay, total white blood cell (WBC) count, C-reactive protein (CRP) serum levels, and, where applicable, blood culture results). In cases where more than one WBC had been effected, only the first count was recorded. Asthma was not considered a chronic underlying disease.

Upper respiratory infection was diagnosed in the presence of rhinorrhea and/or cough, without major systemic disease, and in the absence of wheezing, dyspnea, crepitations, or bronchodilator use. The first episode of acute onset expiratory dyspnea, with previous signs of viral respiratory infection (associated or not with respiratory distress or pneumonia) was diagnosed as bronchiolitis.¹⁷ Children with wheezing, breathlessness, and airway obstruction in whom similar episodes had previously been diagnosed and treated by a physician, were diagnosed with recurrent wheezing. Cases

showing focal infiltrates with consolidation in chest x rays were, in the absence of wheezing, classified as pneumonia.

In order to compare the clinical characteristics associated with hMPV and RSV infections in hospitalised patients, a sample of 95 hospitalised infants (aged <2 years and in whom RSV infection had been documented) was randomly selected from the same population (Excel data analysis function); the number of RSV and hMPV samples was approximately equal. Having excluded cases with co-infections in order to avoid all potential confusion, 88 RSV infants were finally selected.

Values are given as percentages for discrete variables, or as mean and standard deviation for continuous variables. Clinical characteristics and laboratory variables were compared using Student's *t* test, the Mann-Whitney *U* test, the χ^2 test, and Fisher's exact test. A two sided value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were conducted using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS), Version 10.0.

RESULTS

Study population and viral aetiological agents

A total of 749 samples were taken and analysed from 748 children under the age of 2, each of whom had been hospitalised with an acute respiratory infection. All hospitalised patients were included. NPAs were collected from two children whose febrile condition, though not focally specific, showed some very mild upper respiratory symptoms. One hMPV patient who was 25 months old and accidentally admitted to the infant unit, was excluded from the analysis. RSV ($n = 376$) and hMPV ($n = 69$) were the most common causative agents, resulting in 76.1% and 14% (95% CI: 0.11 to 0.16) of 494 virus positive cases, respectively. The remaining viruses studied accounted for 21% of cases (fig 1). Dual or multiple infections were found in 59 (11.9%) cases. Eighteen of the 69 hMPV infections were co-infections (26%). Of the samples positive for hMPV, more were found for the 2001–2002 season compared with the other two seasons. The peak number of hMPV infections occurred in March, followed by February and April (fig 2), the distribution for the three seasons being very similar (data not shown).

Of the 13 children (18.8%) who received antibiotics during their hospital stay, 12 had infiltrate/atelectasis. Blood cultures were negative in all cases, except in one patient with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia with normal chest x rays. Length of hospital stay was 5 ± 2.7 days. One patient with Down's syndrome and interauricular communication

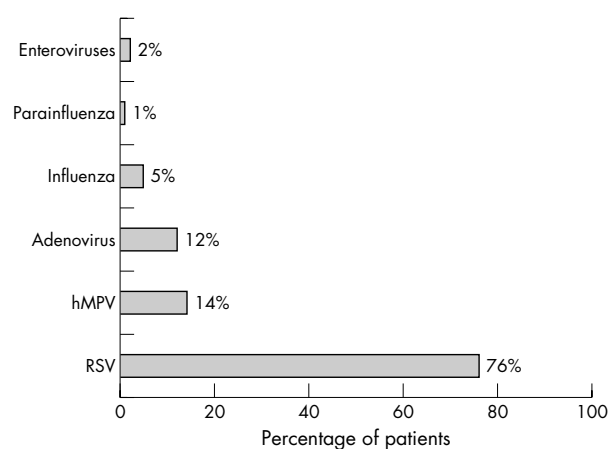


Figure 1 Comparison of the frequency of detection of human metapneumovirus (hMPV) with other respiratory viral pathogens. RSV, respiratory syncytial virus.

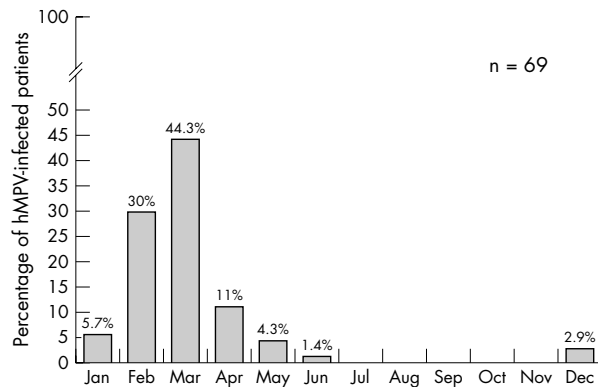


Figure 2 Monthly distribution of hMPV (dual and single infections) between October 2000 and June 2003.

required hospitalisation for 60 days (excluded from the mean). One child, who also had Down's syndrome and interauricular communication, was admitted to the intensive care unit (ICU) and required assisted ventilation. None of the children died.

Clinical features associated with hMPV infection are shown in table 1. hMPV infection occurred in the first year of life in 82.6% of hMPV infected children. Six patients had a chronic disease (chromosomopathy $n=3$, congenital heart disease $n=2$ (with Down's syndrome), cerebral palsy $n=1$, epilepsy $n=1$, and bronchopulmonary dysplasia $n=1$). Ten children (14.4%) had been born prematurely after <37 weeks gestation. One child had been admitted to hospital with recurrent wheezing at 6 months and at 15 months; on both occasions, hMPV was detected in the NPA.

An additional virus was identified in 18 (26%) of the 69 hMPV positive samples: adenoviruses in 10 (55.5%), RSV in six (33.3%), influenza virus in one (5.5%), and other non-respiratory virus in one (5.5%). RSV, adenovirus, and hMPV were simultaneously detected in two patients. The clinical characteristics of single virus infections were similar to those of dual infections (table 2). No co-infection was detected in the patient who required mechanical ventilation.

Comparison with the RSV positive group

The clinical characteristics of hMPV and RSV single infections are summarised in table 3. Recurrent wheezing was the most common diagnosis in the hMPV group ($p=0.001$), though this was closely followed by bronchiolitis. hMPV infections were mainly detected from February to May, while RSV was especially frequent in December and January (fig 3). With regard to age, both viruses particularly affected children under 1 year of age (fig 4). No significant differences were found in any other variable evaluated. Two children in the RSV group and one in the hMPV group were admitted to the ICU. Only the hMPV patient required assisted ventilation.

DISCUSSION

This report is one of the largest paediatric series to date and the largest to come from Spain. Our study provides an estimation of the proportion of hospitalisations due to acute respiratory hMPV related infections among infants under the age of 2. Throughout the three seasons studied, hMPV infections accounted for 9% (95% CI: 0.07 to 0.11) of all respiratory infections and 14% (95% CI: 0.11 to 0.16) of infections with positive viral detection. hMPV infections were less common than RSV infections but more common than adenovirus, influenza, and parainfluenza infections.

Table 1 Clinical features associated with hMPV infection

	hMPV (n=69)
Gender, males (%)	41 (59.4)
Mean age \pm SD (months)	6.9 \pm 5.2
Axillary temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (%)	42 (60.9)
Hypoxia (O_2 sat $< 95\%$) (%)	40 (57.9)
Clinical diagnosis	
Recurrent wheezing (%)	34 (49.3)
Bronchiolitis (%)	32 (46.4)
Upper respiratory infection (%)	1 (1.4)
Fever without source (%)	2 (2.9)
Cobormidity	
Clinical sepsis (%)	1 (1.4)
<i>S pneumoniae</i> bacteremia (%)	1 (1.4)
Otitis (%)	2 (2.9)
Conjunctivitis (%)	1 (1.4)
Increased transaminase levels (%)	1 (1.4)
Prematurity	10 (14.4)
Chest x ray findings	
Chest x ray performed (%)	62 (89.8)
Atelectasis/infiltrate (%)	17 (24.6)
Leukocyte counts (cells/mm ³)	12 500 \pm 4850
Serum CRP levels (mg/l)	24 \pm 36.4

Differences in the methods applied in previous studies make it hard to determine the actual frequency of hMPV infections, as well as their relative significance when compared with other virally induced respiratory infections present in the paediatric population. Most studies included hospitalised children, but whereas some authors investigated the presence of hMPV in samples from all patients enrolled,^{16 18–22} others did so only for negative samples.^{6 8–10 23 24} An additional potentially confusing factor is the different ages of the children studied,^{6 15 18 19 20 25 26} for although hMPV can infect children of any age, its highest incidence is seen in children under the age of 1. In addition, the seasonality of hMPV infections means the identification rate of the virus is very different in different studies depending on the epidemiological seasons investigated.

Most incidence studies examining the presence of hMPV only in negative samples reported a lower frequency of hMPV.^{10 24} In Spain, Vicente *et al*⁶ found hMPV in 4.1% of children under 3 years of age with a negative virological study. Paediatric series in which both positive and negative samples from infants were studied found an hMPV frequency similar to that reported here.^{18 25 27} In our study, the presence of hMPV was investigated in a group of 748 infants under the age of 2 hospitalised for respiratory infection throughout three entire epidemiological seasons, that is, 36 months, without interruption. The overall frequency was 14% and may be an adequate approximation of the actual prevalence of hMPV in this population. The high frequency of hMPV found in this setting suggests investigation of hMPV should be included in the diagnostic routine for respiratory infections among hospitalised infants, as it seems to play a more significant role than adenoviruses and influenza or parainfluenza viruses in this age group. Obviously, improving the aetiological diagnosis of viral infections might avoid unnecessary therapy, antibiotics in particular, and would allow for preventive isolation of infected patients. In our series there are no data available on the prevalence of infection by rhinovirus or coronavirus.

In agreement with several studies, our data show a higher prevalence of hMPV infections in spring and late winter.^{4 9 20 25 28} This seasonal distribution is unlikely to change from one year to another given that in each of the three consecutive seasons studied, peak hMPV activity occurred at the same time. Interestingly, in the French,¹⁰ Dutch,¹⁶ and Norwegian²¹ series, hMPV was mainly found in December

Table 2 Clinical characteristics associated with hMPV infections in hospitalised patients (single and dual infections)

Clinical feature	Dual infection (n=18), n (%)	Single infection (n=51), n (%)	p	OR (95% CI)
Age (months), mean \pm SD	6.9 \pm 5.4	6.9 \pm 5.1	NS	
Male	12 (66.7%)	9 (56.9%)	NS	1.366 (0.581 to 3.209)
Prematurity	2 (11%)	8 (15.7%)	NS	0.738 (0.199 to 2.729)
Temperature $>37.9^{\circ}\text{C}$	12 (66.7%)	30 (58.8%)	NS	1.286 (0.548 to 3.015)
Hypoxia (O_2 sat $<95\%$)	9 (50%)	31 (60.8%)	NS	0.725 (0.329 to 1.599)
Time in hospital (days), mean \pm SD	4.7 \pm 1.6	5.1 \pm 3.0	NS	
Abnormal chest radiograph	5 (27.8%)	12 (23.5%)	NS	1.103 (0.457 to 2.663)
Antibiotic treatment	4 (22.2%)	9 (17.6%)	NS	1.231 (0.484 to 3.129)
Diagnosis				
Bronchiolitis	9 (50%)	23 (45.1%)	NS	1.366 (0.577 to 3.234)
Recurrent wheezing	7 (38.8%)	27 (52.9%)		

and January, as with RSV. Although we should be cautious in our interpretation of these results given that, for some of the studies, full epidemiological seasons were not included, such data may indeed reflect the specifics of hMPV circulation in different countries.

The clinical features in infants with hMPV positive samples were similar to those previously reported.^{1 4 8 10 16 19–21 23 29 30} Our data confirm that diseases related to hMPV in infants are more frequent in those aged <12 months, who represent more than 80% of our inpatients. Most cases were associated with recurrent wheezing or bronchiolitis. Although the study by Rawlinson *et al*³¹ attributed a limited role to hMPV in asthma exacerbations in children, other studies have shown that hMPV is related to asthma exacerbations and wheezing in the paediatric population.^{4 21 26 32 33}

More than half of our patients required oxygen therapy and relatively long hospital stays. One patient required ICU admission and assisted ventilation. These data, together with those published recently in several series reporting hMPV infected patients requiring admission to ICUs and requiring assisted ventilation, illustrate the pathogenetic role of this virus among the paediatric population.^{22 33–35} Two patients with Down's syndrome and congenital heart disease were

among the most severely affected, suggesting that hMPV infections may be more severe in children with underlying diseases. The finding of the same patient suffering from hMPV infections in two different seasons, each requiring admission to hospital, suggests that hMPV infections may not confer permanent immunity, or that viruses from different seasons belong to different lineages.

While data from other reports appear to suggest that dual infection with hMPV and another respiratory virus is rare,^{6 8 18} the high co-infection rate found in our patients (26%) suggests the opposite. This co-infection rate is among the highest reported to date after the series by Greensill *et al*,³⁶ Maggi *et al*,²⁵ and Cuevas *et al*,¹⁹ all of whom reported co-infection in 30%–70% of all hospitalised young children. The overlap in seasonal distribution between hMPV and RSV could explain the high frequency of co-infections. Studying the presence of hMPV only in samples negative for other respiratory viruses might well underestimate the true frequency of hMPV; this is probably one of the most important factors in explaining the different rates of hMPV seen in very similar populations.^{6 7}

The role of hMPV as a concomitant pathogen in these dual infections has not yet been fully established. Some studies^{34 36 37} suggested co-infections are more severe. Other series, however, did not report differences in severity between co-infections and single infections.^{23 27} In our series, there were no significant differences in diagnosis, need for oxygen therapy, length of hospital stay, frequency of fever, antibiotic therapy, or radiological changes between co-infections and single infections, suggesting that the presence of hMPV in the setting of another viral respiratory infection does not make the condition more severe. However, since only one patient required assisted ventilation, the role of co-infections in the most severe disease could not be clearly evaluated in our study.

A comparative analysis of the clinical characteristics of hMPV and RSV infections in patients hospitalised only once

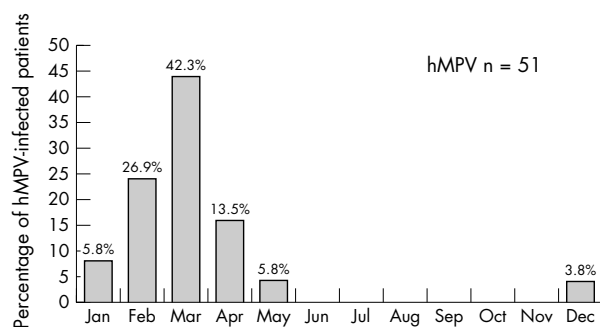
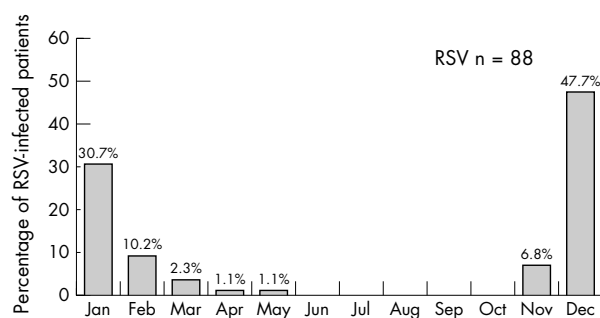
**Figure 3** Monthly distribution of hMPV and RSV single infections.**Figure 4** Age distribution of hMPV and RSV single infections.

Table 3 Clinical characteristics of patients with single human metapneumovirus (hMPV) and respiratory syncytial virus (RSV) infections

Clinical characteristic	hMPV (n = 51)	RSV (n = 88)	p	OR (95% CI)
Age (months), mean \pm SD	6.9 \pm 5.1	6.0 \pm 5.2	NS	
Male	29 (56.9%)	53 (60.2%)	NS	0.916 (0.591 to 1.422)
Prematurity	8 (15.7%)	10 (11.4%)	NS	1.232 (0.698 to 2.175)
Temperature $>37.9^{\circ}\text{C}$	30 (58.8%)	47 (53.4%)	NS	1.150 (0.736 to 1.797)
Hypoxia (O_2 sat $<95\%$)	31 (60.8%)	54 (61.4%)	NS	0.985 (0.630 to 1.539)
Time in hospital (days), mean \pm SD	5.1 \pm 3.0	4.9 \pm 2.2	NS	
Chest radiograph				
Infiltrate/atelectasis	12 (23.5%)	31 (35.2%)		
Normal	33 (64.7%)	54 (61.4%)	NS	
None	6 (11.8%)	3 (3.4%)		
Antibiotic treatment	9 (17.6%)	12 (13.6%)	NS	1.204 (0.694 to 2.088)
Diagnosis				
Bronchiolitis	23 (45.1%)	63 (71.6%)		
Recurrent wheezing	27 (52.9%)	21 (23.9%)	0.001	0.475 (0.309 to 0.731)

What is already known on this topic

- hMPV is a recently described respiratory virus with a characteristic epidemic pattern
- The prevalence of hMPV infection is highest in spring and late winter
- Most hMPV hospitalised children have lower respiratory tract infections

What this study adds

- hMPV infections are clearly related to recurrent wheezing in infants
- Single hMPV and single RSV infections are clinically indistinguishable
- Dual infections are common and clinically similar to single infections

confirmed that both viruses particularly affect children aged <12 months,³⁷ with peak frequency in the first 3 months of life in both groups.³⁸ Almost all children had lower respiratory infection but recurrent wheezing was diagnosed significantly more frequently in the hMPV group, whereas bronchiolitis was the most common diagnosis in the RSV group. Having established that RSV is present at the start of the season, a child with recurrent hMPV induced wheezing could, conceivably, already have suffered an episode of RSV induced bronchiolitis earlier in the year. The severity of the disease associated with both viruses was similar, and no differences could be shown in terms of length of hospital stay, need for oxygen therapy, fever frequency, or history of prematurity or underlying diseases.^{18 30 38} One of the limitations of our work, as with most studies published to date, was that it was not designed to investigate mild or asymptomatic hMPV infections.

In conclusion, our study supports the epidemic nature of hMPV infection, and its significant role as a major pathogen in respiratory tract infection in infants under the age of 2. Within this age group, clinical signs are indistinguishable from those associated with RSV infection. The results obtained to date lead us to recommend that human metapneumovirus be taken into account in the differential diagnosis of acute respiratory infections in hospitalised infants, mainly in order to differentiate these from infections caused by the RSV.

Authors' affiliations

M L García-García, C Calvo, F Martín, Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital, Madrid, Spain

P Pérez-Breña, B Acosta, I Casas, Virology Service, Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Madrid, Spain

This was a substudy of a prospective investigation funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias

Competing interests: none declared

REFERENCES

- 1 Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, *et al*. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;**7**:719–24.
- 2 Peret T, Boivin G, Li Y, *et al*. Characterization of human metapneumovirus isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002;**185**:1660–3.
- 3 Boivin G, Abed Y, Pelletier G, *et al*. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;**186**:1330–4.
- 4 Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo P, *et al*. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;**360**:1393–4.
- 5 Stockton J, Stephenson I, Fleming D, *et al*. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002;**8**:897–901.
- 6 Vicente D, Cilla G, Montes M, *et al*. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:602–3.
- 7 García García ML, Calvo Rey C, Martín del Valle F, *et al*. Infecciones respiratorias por metapneumovirus en lactantes hospitalizados. *An Pediatr (Barc)* 2004;**61**:213–18.
- 8 Esper F, Boucher D, Weibel C, *et al*. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003;**111**:1407–10.
- 9 Esper F, Martinello R, Boucher D, *et al*. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis* 2004;**189**:1388–96.
- 10 Freymuth F, Vabret A, Legrand L, *et al*. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;**22**:92–4.
- 11 Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, *et al*. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 2002;**295**:119–32.
- 12 Coiras MT, Perez-Brena P, García ML, *et al*. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol* 2003;**69**:132–44.
- 13 Coiras MT, Aguilar JC, García ML, *et al*. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004;**72**:484–95.
- 14 López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, *et al*. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005;**129**(1):1–7.

- 15 Casas I, Powell L, Klapper PE, *et al.* New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995;**53**:25–36.
- 16 Van Den Hoogen BG, Van Doornum GJ, Fockens JC, *et al.* Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis* 2003;**188**:1571–7.
- 17 McConnochie K. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child* 1983;**137**:11–13.
- 18 Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, *et al.* High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:3043–5.
- 19 Cuevas L, Ben Nasser A, Dove W, *et al.* Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:1626–8.
- 20 Boivin G, De Serres G, Côté S, *et al.* Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:634–40.
- 21 Døllner H, Risnes K, Radtke A, *et al.* Outbreak of human metapneumovirus infection in Norwegian children. *Pediatr Infect Dis J* 2004;**23**:436–40.
- 22 Iipma FF, Beekhuis D, Cotton MF, *et al.* Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *J Med Virol* 2004;**73**:486–93.
- 23 Williams J, Harris P, Tollefson S, *et al.* Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;**350**:443–50.
- 24 Galiano M, Videla C, Sánchez S, *et al.* Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* 2004;**72**:299–303.
- 25 Maggi F, Pfferi M, Vatteroni M, *et al.* Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:2987–91.
- 26 Peiris J, Tang W-H, Chan K, *et al.* Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:628–33.
- 27 Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, *et al.* Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol* 2004;**30**:267–70.
- 28 Robinson JL, Lee BE, Bastien N, *et al.* Seasonality and clinical features of human metapneumovirus infection in children in Northern Alberta. *J Med Virol* 2005;**76**(1):98–105.
- 29 von Linstow ML, Henrik Larsen H, Eugen-Olsen J, *et al.* Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in hospitalized Danish children with acute respiratory tract infection. *Scand J Infect Dis* 2004;**36**:578–84.
- 30 Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, *et al.* Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2004;**10**:700–5.
- 31 Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, *et al.* Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis* 2003;**187**:1314–18.
- 32 Basis S, Esposito S, Niersters H, *et al.* Impact of human metapneumovirus in childhood: comparison with respiratory syncytial virus and influenza virus. *J Virol* 2004;**75**:101–4.
- 33 Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, *et al.* Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis* 2004;**10**:1095–101.
- 34 König B, König W, Arnold R, *et al.* Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:4632–5.
- 35 Ulloa-Gutiérrez R, Skippen P, Synnes A, *et al.* Life-threatening human metapneumovirus pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation in a preterm infant. *Pediatrics* 2004;**114**:e517–9.
- 36 Greensill J, McNamara P, Dove W, *et al.* Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:372–5.
- 37 Semple MG, Cowell A, Dove W, *et al.* Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005;**191**:382–6.
- 38 McAdam AJ, Hasenbein ME, Feldman HA, *et al.* Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. *J Infect Dis* 2004;**190**:20–6.

Call for Book Reviewers

Book reviews are a popular feature of ADC, and many readers use them to decide how best to spend scarce library funds. We need to recruit a team of willing reviewers, both generalists and specialists, who are prepared to read and review new books (and CD-ROMs, etc) within a three-month deadline: could you help? You will have the option to decline if you can't manage a review in time.

Unfortunately ADC cannot pay reviewers, but you will be able to keep the book for yourself or your department. Trainees are particularly welcome to apply.

For logistical reasons reviewers should be based in the UK or Republic of Ireland and internet access is essential.

Please contact archdischild@bmjgroup.com with brief details of special interests and reviewing experience, if any (include BOOK REVIEWS in the subject field).

Prevalence and Clinical Characteristics of Human Metapneumovirus Infections in Hospitalized Infants in Spain

M.L. García-García, MD,^{1*} C. Calvo, PhD,¹ P. Pérez-Breña, PhD,²
J.M. De Cea, MD,¹ B. Acosta, MD,² and I. Casas, PhD²

Summary. Human metapneumovirus (hMPV), a condition recently described in the Netherlands, causes lower respiratory infections, particularly in young children and among the elderly. The objective of this study was to describe the characteristics of hMPV infections in hospitalized infants <2 years of age and to compare them to those of infections caused by respiratory syncytial virus (RSV). A prospective study was conducted on the clinical characteristics of infants admitted to hospital for respiratory infection through 5 years. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, RSV, and adenoviruses was performed in clinical samples by multiple reverse transcription nested-PCR assay. The presence of hMPV was tested in all samples using two separate RT-PCR tests. Some respiratory virus was detected in 70.5% of the 1,322 children included in the study. hMPV was found in 101 of the positive nasopharyngeal aspirates (10.8%), and was the most common virus after RSV and rhinovirus. Peak incidence was found in March. Over 80% of children were <12 months. The more common diagnoses were bronchiolitis (49.5%) and recurrent wheezing (45.5%). Fifty-four percent of cases required oxygen therapy and, one percent, assisted ventilation. Thirty percent were co-infections, with clinical characteristics indistinguishable from single infections. Seventy-one hMPV single infections were compared to 88 RSV single infections. hMPV infections were significantly more frequent than RSV in infants older than 6 months ($P=0.04$). Recurrent wheezing was diagnosed more frequently in hMPV patients ($P=0.001$). All other variables tested were similar, in both groups. hMPV was the third most frequent virus after RSV and rhinovirus in infants <2 years of age, hospitalized for respiratory infection, and was associated with bronchiolitis and recurrent wheezing. hMPV predominantly occurred in spring. Co-infections were frequent and clinically similar to single infections and RSV infections. **Pediatr Pulmonol.**

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: metapneumovirus; respiratory syncytial virus; infants; respiratory infections.

INTRODUCTION

Human metapneumovirus (hMPV), recently described in the Netherlands,¹ is a RNA virus belonging to the *Paramyxoviridae* family, subfamily *Pneumovirinae*, genus *Metapneumovirus*. Although hMPV was described only few years ago, a 100% seroprevalence has been found in samples obtained 50 years ago.¹ It is, therefore, believed it has been circulating in humans for over five decades. The difficulties in isolating this type of virus from cell cultures have, possibly, delayed its detection as a common pathogen in children's respiratory infections. Over the past 4 years, this virus has been identified in patients with respiratory disease in many countries, including Canada,^{2,3} Finland,⁴ United Kingdom,⁵ Spain,^{6,7} the United States,^{8,9} or France.¹⁰

hMPV is genetically similar to avian pneumovirus, particularly serotype C. Two main groups A and B have been identified to date. The phylogenetic studies conducted by the Dutch group¹¹ show a high similarity to the respiratory syncytial virus (RSV), with which it shares

morphological similarities and similar infective capacity and spectrum of disease. Upper and lower respiratory tract infections, from common colds to pneumonia, are attributed to hMPV, with bronchiolitis being the main clinical sign of primary infection.¹⁰ In addition, it seems to play a significant role in recurrent wheezing episodes in the first years of life.⁷

¹Department of Pediatrics, Severo Ochoa Hospital, Madrid, Spain.

²Virology Service, Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, National Center of Microbiology, ISCIII, Madrid, Spain.

*Correspondence to: M.L. García-García, M.D., Servicio de Pediatría, Hospital Severo Ochoa, Avenida Orellana s/n, Leganés, 28911, Madrid, Spain. E-mail: marialuzgarcia@terra.es

Received 29 August 2005; Revised 19 March 2006; Accepted 7 April 2006.

DOI 10.1002/ppul.20456
Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com).

From an epidemiological point of view, hMPV infection appears seasonal in its behavior, with a pattern similar to that of the RSV infection, though, at present, few prospective studies exist on its year-round behavior.

We had previously reported hMPV infection in 18 infants aged under 2, admitted to hospital throughout 2002/03.⁷ Our objectives were, now, to estimate the relative contribution of hMPV in the hospitalization of infants with acute respiratory tract infection, here, in Spain, and to define the clinical and epidemiological characteristics of hMPV infection as compared to RSV infection, over 5 years.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

This was a substudy of an ongoing prospective investigation on respiratory tract infections in children under 2 years of age, funded by Spain's "Fondo de Investigaciones Sanitarias." The study was conducted at the Pediatrics Department of the "Severo Ochoa Hospital" in Madrid, Spain. All children recruited were under the age of 2 and all, consecutively, admitted to our hospital for acute respiratory infections, year-round, between October 2000 and June 2005. The sole exclusion criterion applied was cystic fibrosis. All parents were duly advised, upon admission, that clinical data related to their children might be used for clinical research purposes. Furthermore, in each case, informed verbal consent was obtained from each of the parents or legal guardians.

Nasopharyngeal aspirates (NPA) were taken from each patient upon admission and sent to the Respiratory Virus Laboratory of the National Microbiology Center (ISCIII, Madrid, Spain). Samples were processed within 24 h of collection, for virological study. Indirect immunofluorescence assays and multiplex RT-nested-PCR were carried out on every sample in order to detect RSV, influenza viruses, and adenovirus.¹² In the last 2 years, a second multiplex RT-PCR was also performed to detect parainfluenza viruses, coronaviruses, enteroviruses, and rhinoviruses.¹³

A 200 µl aliquot was taken from each NPA sample—all the necessary precautions being taken to avoid contamination—and then frozen, at -70°C , until the analysis for hMPV was carried out.

Amplification of Viral Nucleic Acids for Metapneumovirus Detection

All samples were investigated for hMPV using specific amplification methods, regardless of the existence of a previous positive or negative result for other viruses. Detection of hMPV in respiratory secretions from patients was performed using two separate RT-PCR assays designed in two different genes: one gene encoding for the matrix protein (M), and another gene encoding for the

viral polymerase (L), as described elsewhere.¹⁴ Specific primer pairs were designed to amplify highly conserved regions of both *M* and *L* genes. Nucleic acids from 200 µl aliquots of original samples were extracted as previously described.¹⁵

For reverse transcription and PCR amplification of the *M* gene, a commercial kit (Qiagen One-Step RT-PCR Kit, Qiagen, Valencia, CA) was used. A subsequent half-nested PCR reaction was performed, using a total of 2 µl from the first reaction products, which were added to the reaction mixture up to a final volume of 50 µl. The amplified products were analyzed by gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and a 687 bp band was obtained.

The polymerase gene fragment was amplified using L6 and L7 oligonucleotides.¹⁶ The L6 oligonucleotide was labeled at the 5' end with biotin to allow for detection of the PCR product by chemoluminescence. The specific probe designed to be used in the reverse line blot hybridization with the PCR product was 5' end amino-labeled. For the RT-PCR reaction, the Qiagen One Step RT-PCR kit was also used. The resulting amplified and labeled DNA was subjected to membrane hybridization with a specific probe, after which the membrane was washed and finally treated with a streptavidine-peroxidase conjugate (Roche, Indianapolis, IN). The resulting products were detected by chemoluminescence with ECL detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

After optimizing assay conditions, both assays showed similar sensitivity, equivalent to 0.1 TCID₅₀ of the hMPV NL/1/99 strain, used by way of a positive control. Specificity of both methods was tested using RNA extracted for studying different respiratory viruses: influenza A, B, and C, RSV A and B, parainfluenza 1, 2, 3, and 4, adenoviruses, and enteroviruses.

NPA were only considered positive for the presence of hMPV when a positive result for this virus was obtained in both independent RT-PCR assays.

Sequencing of hMPV *M* Gene

To check the specificity of the results, *M* gene amplified products obtained from selected positive clinical samples were sequenced in an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the DNA Sequencing Facility, Genomics Unit (National Microbiology Center). The hMPV sequences for *M* gene (462nt) presented in this article have been deposited in the GenBank database under the accession numbers DQ439949-DQ439961.

Phylogenetic Analysis

Nucleotide sequence alignments were generated with ClustalX 1.81 software. The total length of alignment

was 462nt. Phylogenetic analysis was conducted using MEGA version 3.0 software.¹⁷ The following strains from the database were used for comparisons: AY830147_(BJ1887), AY830146_(BJ1816), AY145271_(CAN00-16), AY145270_(CAN00-15), AY145269_(CAN00-14), AY145268_(CAN00-13), AY145267_(CAN00-12), AY145266_(CAN97-83), AY145265_(CAN97-82), AY145264_(CAN99-81), AY145263_(CAN98-79), AY145262_(CAN98-78), AY145261_(CAN98-77), AY145260_(CAN98-76), AY145259_(CAN98-75), AY145258_(CAN98-74), AY145257_(CAN98-73), AY525843_(NL/1/99), AF371337_(00-1), AY530095_(JPS03-240), AY530094_(JPS03-194), AY530093_(JPS03-187), AY530092_(JPS03-180), AY530091_(JPS03-178), AY530090_(JPS03-176), AY530089_(JPS02-76).

Clinical Assessment and Statistical Analysis

During the hospital stay, and as part of the study, physician filled out a study-questionnaire with the following variables: age, sex, month of admission, clinical diagnosis, history of prematurity and underlying chronic diseases, need for oxygen therapy evaluated through transcutaneous oxygen saturation, axillary temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$, presence of infiltrate/atelectasis in chest X-rays, administration of antibiotic therapy, time of hospital stay, total white blood cell (WBC) count, C-reactive protein (CRP) serum levels, and result of blood culture when performed. In this study, asthma or recurrent wheezing was not considered a chronic underlying disease.

Upper respiratory tract infection (URTI) was diagnosed when rhinorrhea and/or cough was found (in the absence of wheezing, dyspnea, crackling rales, or bronchodilator use), whether with or without fever. All the classic criteria, present in an initial episode of acute onset expiratory dyspnea with previous signs of viral respiratory infection—whether or not this was associated to respiratory distress or pneumonia—were applied in diagnosing *bronchiolitis*.¹⁸ Children with wheezing, breathlessness, and obstruction of the airways, in whom similar episodes had previously been diagnosed and treated by a physician, were diagnosed with *recurrent wheezing*. Cases with both focal infiltrates and consolidation in chest X-rays were, in the absence of wheezing, classified as *pneumonia*.

In order to compare the clinical characteristics associated to hMPV and RSV infections, a random sample of 95 hospitalized infants—aged <2 and documented as RSV-infected—was selected from the same population. Simple random sampling was performed with Excel data analysis function. Cases with dual viral detections were excluded to avoid the potential confounding role of co-infections, and 88 RSV infants were actually selected.

Values are given as percentages for discrete variables, or as mean and standard deviation for continuous variables. Clinical characteristics and laboratory variables were compared applying Student's *t*-test, Mann–Whitney's *U*-test, the χ^2 Test, and Fisher's Exact Test. A two-sided value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Version 10.0.

RESULTS

Study Population and Viral Etiologic Agents

The study population consisted of 1,322 hospitalized infants, <2 years of age, with acute respiratory infection. At least 1 respiratory virus was detected in 933 samples (70.5%). Of the positive samples, 599 (64.2%) were RSV, and 101 (10.8%) were hMPV (10.8%, 95% CI: 11.8, 9.8). hMPV accounted for 7.6% of all studied specimens. All other viruses detected were (in descending order of frequency) adenoviruses, influenza viruses, and parainfluenza viruses (Fig. 1). Rhinovirus infections were found in 101 cases (23% of viral detections, from October 2003 to September 2005). Influenza C virus was detected in six cases. Dual or multiple infections were found in 153 cases (16.4%). Thirty of the 101 hMPV infections were co-infections (29.7%).

A higher number of hMPV-positive samples were found in the 2001–02 season as compared to the other four seasons (Fig. 2). The peak number of hMPV infections occurred in March, followed by February, and then April (Fig. 3), distribution patterns remaining similar throughout the 5 years (data not shown).

Thirteen positive samples were selected at random and sequenced. The analysis of hMPV *M* gene was performed by comparison with 26 sequences obtained from the database. Selected samples were distributed from 2001, 2002, 2003, and 2004 seasons. Phylogenetic analysis

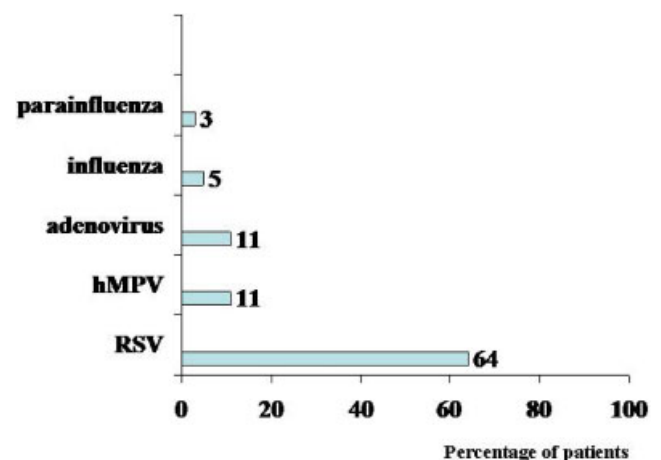


Fig. 1. Comparison of human metapneumovirus (hMPV) detection frequency with other respiratory viral pathogens.

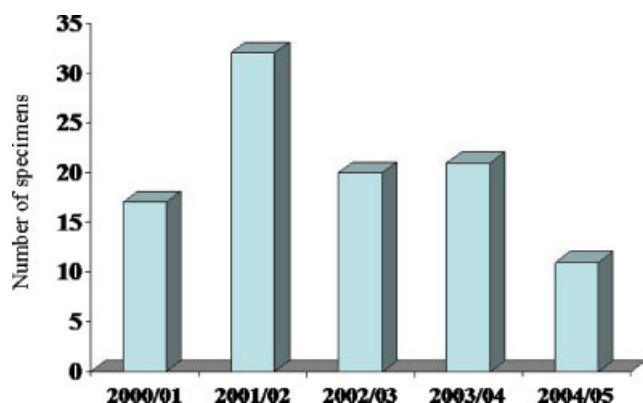


Fig. 2. Nasopharyngeal aspirates for human metapneumovirus at the Severo Ochoa Hospital, October 2000–June 2005.

(Fig. 4) indicated two main groups A and B each divided into two subgroups (A1 and A2, B1 and B2). Bootstrap values were 100 for main groups and >90 for each subgroup. hMPVs from our children belonged into both A and B groups of viruses which cocirculated throughout 2003–2004 season. During epidemics 2001–2002, 2002–2003, and 2003–2004 subgroups A1 and A2 cocirculated.

Clinical Characteristics Associated With hMPV Infection

Clinical characteristics for the 101 infants with hMPV infection are shown in Table 1. Till now, most patients had, otherwise, been in good health. Eight of the 101 patients had underlying medical problems: chromosomopathy $n=3$, congenital heart disease $n=2$ (with Down's syndrome), cerebral palsy $n=1$, epilepsy $n=1$, Prader–Willy syndrome, and bronchopulmonary dysplasia $n=1$.

The most frequent diagnoses were bronchiolitis and recurrent wheezing. Fourteen hMPV infants with recurrent

wheezing had, previously, been admitted for bronchiolitis, in 13 cases, and for recurrent wheezing, in 1 case. Seven of these previous episodes were RSV-infection-related.

Otitis media developed in six children and conjunctivitis in two, although two children showed increased transaminase levels. One child had been admitted to hospital with recurrent wheezing at 6 months and, again, at 15 months. On both occasions, NPA detected hMPV.

Of the chest X-rays obtained in 91 cases, 25.7% showed infiltrate/atelectasis. Serum CRP levels were significantly higher in children with infiltrates as compared to those showing no significant radiological changes ($58.3 \text{ mg/l} \pm 70.9$ vs. $19.7 \text{ mg/l} \pm 28.5$, $P: 0.02$). Blood cultures were negative in all cases, except one case where normal chest X-rays revealed *Streptococcus pneumoniae*-induced bacteremia.

Respiratory infection-related hospital stays went from 4.9 ± 2.6 days. One hMPV-infected infant, with Down's syndrome and interauricular communication, was hospitalized for 60 days due to persistent and severe respiratory repercussion. One child was admitted to the intensive care unit (ICU) and required assisted ventilation. None of the children died.

Those hMPV-infected children under 6 months ($n=45$) suffered significantly fewer cases of hypoxia, fever, and radiological alterations than hMPV-infected children over 6 months ($n=56$) (Table 2). Bronchiolitis diagnosis were most frequent among members of the younger age group ($P < 0.001$).

Additional viruses were identified in 30 (29.7%) of the 101 hMPV-positive samples as follows RSV in 7 (23.3%), adenoviruses in 13 (43.5%), influenza virus in 1 (3.5%), and enterovirus in 1 (3.5%). RSV, adenovirus, and hMPV were, simultaneously, detected in two patients.

Clinical characteristics of single virus infections were similar to those of dual infections (Table 3). Patients who

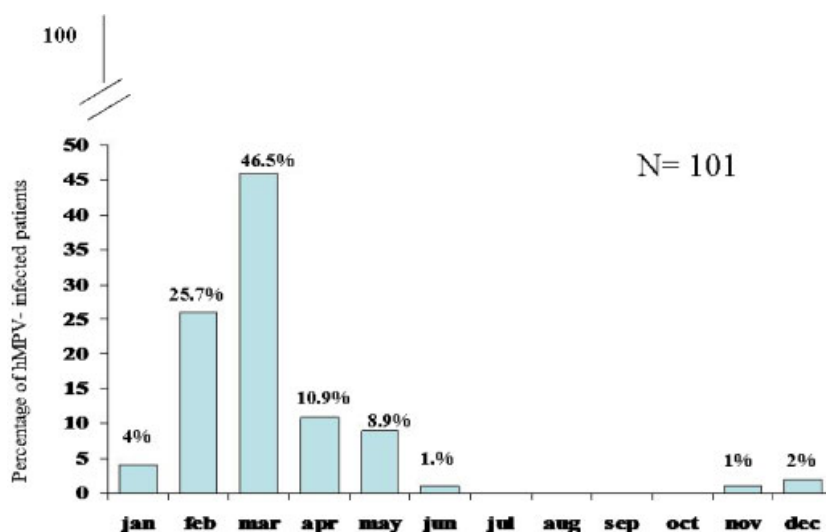


Fig. 3. Monthly distribution of hMPV (dual and single infections) between October 2000 and June 2005.

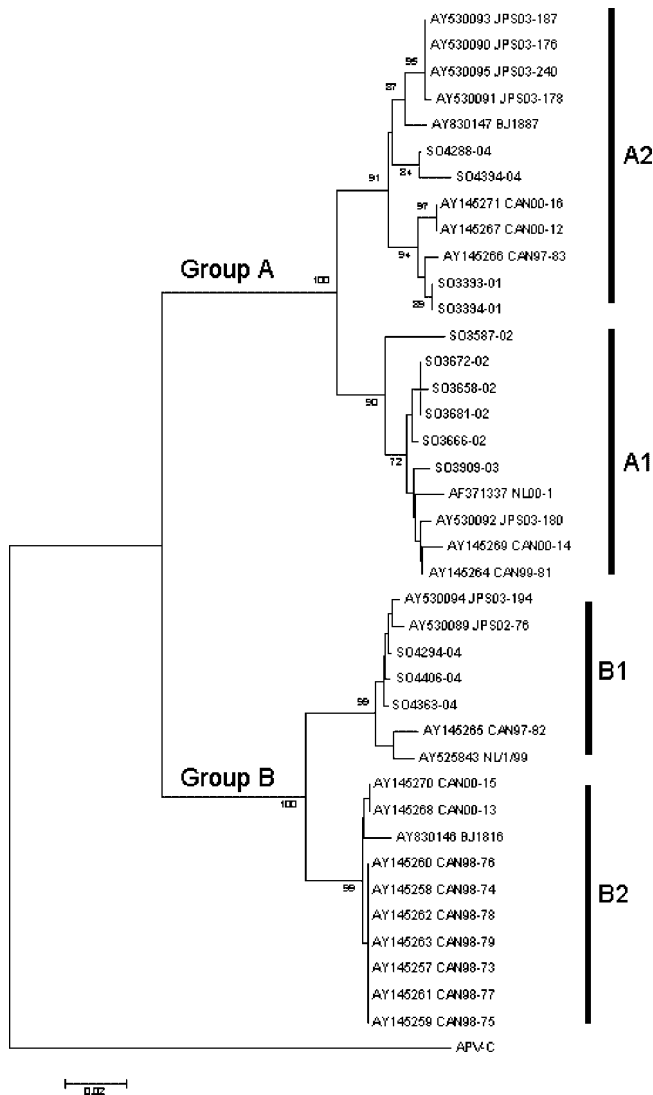


Fig. 4. The set of nucleotide sequences was aligned with Clustal W. Phylogenetic analysis was performed using the Kimura two-parameter model as a model of nucleotide substitution and using the neighbour joining method to reconstruct the phylogenetic tree (MEGA version 3.0 software package). The statistical significance of the phylogenies constructed was estimated by bootstrap analysis with 1,000 pseudoreplicate data sets.

required mechanical ventilation had no co-infection with any other respiratory virus.

Comparison to the RSV-Positive Group

Clinical data from patients with single hMPV infection ($n = 71$) were compared to those from patients with single RSV infection ($n = 88$) (Table 4).

Diagnosis of bronchiolitis was significantly more frequent in RSV-infected children ($P = 0.001$). Recurrent wheezing was the most common diagnosis in the hMPV group, though this was closely followed by bronchiolitis. hMPV infections were, mainly, detected from February to

TABLE 1—Clinical Characteristics Associated With Single hMPV Infections ($N = 71$)

Clinical feature	N (%)
Age (months) ¹	7.5 \pm 5.5
Male	42 (59.2%)
Prematurity	11 (15.5%)
Temperature $>37.9^{\circ}\text{C}$	45 (63.4%)
Hypoxia (Sat O ₂ $<95\%$)	41 (57.7%)
Time in hospital (days) ¹	4.9 \pm 2.8
Abnormal chest radiograph	18 (25.4%)
Antibiotic treatment 14 (19.7%)	
Diagnosis	
Bronchiolitis	33 (46.5%)
Recurrent wheezing	35 (49.2%)
Pneumonia	2 (2.8%)
Upper respiratory infection	1 (1.4%)

¹Mean \pm standard deviation.

May, although RSV was found, more specifically, in December and January. As regards age, children under 1 year were particularly affected by both viruses and, though no significant mean age differences could be established, hMPV infection was found to be more prevalent among those over 6 months ($P = 0.04$).

No differences were found in any of the other variables evaluated. Two children in the RSV group and one in the hMPV group were admitted to the intensive care unit. Only the hMPV patient required assisted ventilation.

DISCUSSION

This report not only constitutes one of the largest pediatric series to date; it is the largest of its kind to be published in Spain. Our study provides an accurate estimation as to hospitalization proportionality due to acute respiratory hMPV-related infections, among infants under the age of 2 years. Throughout the 5 years of consecutive study, hMPV infections accounted for 7.6% of all respiratory infections and 11% of infections with positive viral detection. hMPV infections were surpassed only by RSV and rhinovirus infections, and are more common than adenovirus, influenza, and parainfluenza infections.

Given the vast methodological diversity employed in previous studies, it is difficult to estimate what the current frequency of hMPV infections might be or, even, what relative significance they bear when compared to infections caused by other respiratory viruses, within the pediatric population. Most studies included hospitalized children; but, although some authors investigated the presence of hMPV in samples from all patients enrolled,^{16,19,21–24} others did so only with the negative samples.^{6,8–10,25,26} Another potentially confounding factor is the different ages of the children studied; for, though hMPV can infect children at any age, its highest incidence

TABLE 2—Clinical Characteristics of Single hMPV Infections in Infants < and > 6 Months

Clinical feature	<6 months N = 32	>6 months N = 39	P	OR
Diagnosis				
Bronchiolitis	23 (74.2%)	10 (27.2%)	<0.001	3.049 (1.594–5.834)
Recurrent wheezing	8 (25.8%)	27 (73%)	<0.001	0.328 (0.171–0.627)
Temperature >37.9°C	15 (46.9%)	30 (77%)	0.009	0.510 (0.310–0.840)
Hypoxia (Sat O ₂ <95%)	14 (43.8%)	27 (69.2%)	0.031	0.569 (0.340–0.953)
Chest X-ray (infiltrate/atelectasis)	4 (13.8%)	14 (41.2%)	0.016	0.400 (0.162–0.987)

is seen in children under the age of 1. Thus, although some series only included children under 2–3 years old,^{6,16,19–21} others included children under 5;^{8,9,26} others, even reported patients whose ages ranged from 0 to 18.^{4,10,23,27} In addition, the seasonality of hMPV infections causes the identification rate of the virus to be very different from some studies to others if complete epidemiological seasons are not studied.

Most incidence studies investigating the presence of hMPV, solely in negative samples, reported a lower frequency of hMPV. For instance, 4.4% in children under 5, in an Argentinean series,²⁶ or 6.6% of children—aged 3 months to 12 years—in the French group.¹⁰ In Spain, Vincente et al.⁶ found hMPV in 4.1% of children under 3 years old whose virological study came out negative. Pediatric series, where both positive and negative infant samples were studied, found an hMPV frequency similar to ours.^{19,20,28} In our study, hMPV presence was investigated in 1,322 infants under 2, hospitalized for respiratory infection over 5 years. Overall frequency was 7.6% and 11% of positive samples. These figures could well be an adequate approximation as to the true prevalence of hMPV for this population. This setting's high hMPV frequency reinforces the need for inclusion of

hMPV detection processes in the diagnostic routine for respiratory infections, in hospitalized infants, given that hMPV appears to play a more significant role than adenoviruses and influenza or parainfluenza viruses, in this age group.

As in various other studies, our study-data indicates a higher prevalence of hMPV infections in the late winter months and in spring.^{4,9,20,22} This seasonal distribution seems unlikely to change from 1 year to another, given that, for the five consecutive seasons studied, peak hMPV activity persisted in these same months. Interestingly, in the French,¹⁰ Dutch¹⁶, and Norwegian²³ series, hMPV prevalence occurred mainly in December and January, as did RSV. Given that complete epidemiological seasons were not included in some of these studies, a degree of caution would appear to be in order, when interpreting these results. Potentially, however, this data could reflect the varied nature of hMPV circulation in different countries.

Clinical characteristics in infants with hMPV-positive samples were similar to those previously reported.^{1,4,8,10,16,21–23,25,29,30} (Our data confirms that hMPV-related diseases are more frequent in children <12 months, who, in turn, represent over 80% of our inpatients). Our data suggest that hMPV-related diseases, in infants, are more frequent in those aged <12 months, who, in turn, represent over 80% of our inpatients. From our results, we are able to determine that clinical affection in infants, under 6 months, is less severe than in older children. Most cases were associated with bronchiolitis or recurrent wheezing. Although the study conducted by Rawlinson et al.³¹ attributed a limited role to hMPV in asthma exacerbations in children, other studies found that hMPV was related to asthma exacerbations and wheezing in the pediatric population.^{4,23,27,32,33} Our data clearly indicates that hMPV is associated with recurrent wheezing, certainly in hospitalized children aged <2.

Over half of our patients required oxygen-therapy and relatively long hospital stays. One patient required ICU admission and assisted ventilation. This data, in addition to that which was recently published in several series—reporting hMPV-infected patients who had to be admitted to ICUs and who required assisted ventilation—serves to

TABLE 3—Clinical Characteristics Associated With Hospitalized hMPV Infections (Single vs. Dual Infections)

Clinical feature	Dual infection (N = 30)	Single infection (N = 71)	P
	N (%)	N(%)	
Age (months) ¹	6.8 ± 4.9	7.4 ± 5.5	NS
Male	21 (70%)	42 (59.2%)	NS
Prematurity	6 (20.7%)	11 (15.5%)	NS
Temperature >37.9°C	20 (66.7%)	45 (63.4%)	NS
Hypoxia (SatO ₂ <95%)	15 (50%)	41 (57.7%)	NS
Time in hospital (days) ¹	4.9 ± 1.8	5.6 ± 7.1	NS
Abnormal chest radiograph	8 (26.6%)	18 (25.3%)	NS
Antibiotic treatment	6 (20%)	14 (19.7%)	NS
Diagnosis			
Bronchiolitis	17 (56.6%)	33 (46.4%)	NS
Recurrent wheeze	11 (36.6%)	35 (49.2%)	

%, columns.

¹Mean ± standard deviation.

TABLE 4—Clinical Characteristics of Patients With Single Human Metapneumovirus (hMPV) Versus Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infections

Clinical characteristic	hMPV (N = 71)	RSV (N = 88)	P	OR
Age (months) ¹	7.4 ± 5.5	6.0 ± 5.2	NS	
Age <6 months	32 (45.1%)	54 (61.4%)	0.04	0.696 (0.492–0.987)
Male	42 (59.2%)	53 (60.2%)	NS	
Prematurity	11 (15.5%)	10 (11.4%)	NS	
Temperature >37.9°C	45 (63.4%)	47 (53.4%)	NS	
Hypoxia (SatO ₂ <95%)	41(57.7%)	54 (61.4%)	NS	
Time in hospital (days) ¹	4.9 ± 2.8	4.9 ± 2.2	NS	
Chest radiograph				
Infiltrate/atelectasis	18 (25.4%)	31 (35.2%)		
Normal	45 (63.4%)	54 (61.4%)	NS	
Not done	8(11.3%)	3 (3.4%)		
Antibiotic treatment	14 (19.7%)	12 (13.6%)	NS	
Diagnosis				
Bronchiolitis	33 (46.5%)	63 (71.6%)	0.001	0.550 (0.390–0.775)
Recurrent wheeze	35 (49.2%)	21 (23.9%)		

¹Mean ± standard deviation.

illustrate the pathogenetic role of this virus, in the pediatric population.^{24,33–35} In discovering a patient with contracted two hMPV infections, in two different seasons, and requiring hospital admission on both occasions, we learn that hMPV infections may not confer permanent immunity, or that viruses from different seasons belong to different lineages, as it is shown in Figure 4.

Our work, as with most studies published to date, was not designed to study mild or asymptomatic hMPV infections. However, the results of both Van den Hoogen et al.^{1,16} and Williams et al.²⁵ suggest that subclinical or asymptomatic infections are, indeed, very rare in young children.

Whereas data from other reports suggest that dual infection with hMPV and other respiratory viruses is rare,^{6,8,19} the high co-infection rate found in our patients (29.7%) appears to suggest quite the opposite, the co-infection rate being among the highest reported to date, after the series by Greensill et al.³⁶, Maggi et al.²⁰, and Cuevas et al.²¹ The seasonal distribution overlap between hMPV and RSV could well explain the high frequency of co-infections. True hMPV-frequency may be underestimated if its presence is studied only in samples testing negative for other respiratory viruses. This is probably one of the most important factors in explaining the varied hMPV-incidence rates seen in very similar populations.^{6,7}

The role of hMPV as a concomitant pathogen in these dual infections has not yet been fully established. Some studies, such as those by Greensill et al.,³⁶ König et al.³⁴, and Semple et al.³⁷ suggest greater severity of co-infections. However, other series did not report severity differences between co-infections and single infections.^{25,28} In our series, there were no significant differences in diagnosis, oxygen-therapy requirements,

length of hospital stay, fever frequency, antibiotic therapy, or in radiological changes, between co-infections and single infections. All of which would appear to suggest that the presence of hMPV in the setting of another viral respiratory infection does not make the condition more severe. However, the role of co-infections in the most severe disease could not clearly be evaluated in our study, seeing as only one patient required assisted ventilation.

A comparative analysis of clinical characteristics in hMPV and RSV single infections suggests that hMPV infections are more frequent in infants over 6 months, compared to RSV. Almost all children suffered fewer respiratory infections, yet recurrent wheezing was diagnosed significantly more frequently in the hMPV group, whereas bronchiolitis was the most common diagnosis in the RSV group. The severity of the disease associated with both viruses was similar, and no differences could be shown either in terms of length of hospital stay, oxygen-therapy requirements, and fever frequency, nor in the patient's prematurity or underlying disease history.^{19,30,38}

In conclusion, our study supports both the epidemic nature of hMPV infection and its significant role as a major pathogen in RTI, in infants under the age of 2. Results obtained to date, lead us to recommending that hMPV be taken into account in the differential diagnosis of acute respiratory infections in hospitalized infants, principally, to ensure that they are distinguished from respiratory syncytial-virus infections.

REFERENCES

1. Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719–724.

2. Peret T, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, Erdman DD, Anderson LJ. Characterization of human metapneumovirus isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002;185:1660–1663.
3. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, Peret TC, Erdman DD, Anderson LJ. Virological characteristics and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: A new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;186:1330–1334.
4. Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360:1393–1394.
5. Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002;8:897–901.
6. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:602–603.
7. García García ML, Calvo Rey C, Martín del Valle F, Lopez Huertas MR, Casas Flecha I, Diaz-Delgado R, Perez-Brena P. Infecciones respiratorias por metapneumovirus en lactantes hospitalizados. *An Pediatr (Barc)* 2004;61:213–218.
8. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: Clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003;111:1407–1410.
9. Esper F, Martinello R, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis* 2004;189:1388–1396.
10. Freymouth F, Vabret A, Legrand L, Eterradosi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guillois B. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Ped Infect Dis J* 2003;22:92–94.
11. Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 2002;295:119–132.
12. Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol* 2003;69:132–144.
13. Coiras MT, Aguilar JC, Garcia-Garcia ML, Casas I, Perez-Breña P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested PCR assays. *J Med Virol* 2004;72:484–495.
14. López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, García-García ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005;13 [Epub ahead of print].
15. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*. 1995;53: 25–36.
16. Van Den Hoogen BG, Van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, Osterhaus AD, Fouchier RA. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis*. 2003;188:1571–1577.
17. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150–163.
18. McConnochie K. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child* 1983;137:11–13.
19. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:3043–3045.
20. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Ragazzo V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infant in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:2987–2991.
21. Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1626–1628.
22. Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, Bergeron MG, Dery P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;9: 634–640.
23. Døllner H, Risnes K, Radtke A, Nordbo SA. Outbreak of human metapneumovirus infection in Norwegian children. *Ped Infect Dis J* 2004;23:436–440.
24. Ijpmma FF, Beekhuis D, Cotton MF, Pieper CH, Kimpen JL, van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Osterhaus DM. Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *J Med Virol* 2004;73:486–493.
25. Williams J, Harris P, Tollefson S, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;350:443–450.
26. Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarria M, Carballal G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* 2004;72:299–303.
27. Peiris J, Tang W-H, Chan K, Khong PL, Guan Y, Lau YL, Chiu SS. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2003;9: 628–633.
28. Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, Constantopoulos AG, Kafetzis D, Papadopoulos NG. Human Metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol* 2004;30:267–270.
29. von Linstow ML, Henrik Larsen H, Eugen-Olsen J, Koch A, Nordmann Winther T, Meyer AM, Westh H, Lundgren B, Melbye M, Hogh B. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in hospitalized Danish children with acute respiratory tract infection. *Scand J Infect Dis*. 2004;36:578–584.
30. Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, Edwards K, Hall CB, Walker FJ, Iwane M, Anderson LJ. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2004;10:700–705.
31. Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis*. 2003;187:1314–1318.
32. Bosis S, Esposito S, Niersters HG, Crovari P, Osterhaus AD, Principi N. Impact of human metapneumovirus in childhood: Comparison with respiratory syncytial virus and influenza virus. *J Virol* 2004;75:101–1044.
33. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den Hoogen B, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1095–1101.
34. König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol*. 2004;42: 4632–4635.
35. Ulloa-Gutiérrez R, Skippen P, Synnes A, Seear M, Bastien N, Li Y, Forbes JC. Life-threatening human metapneumovirus

pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation in a preterm infant. *Pediatrics* 2004;114:e517–e519.

36. Greensill J, McNamara P, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003;9:372–375.
37. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Shears P, Smyth RL, Hart CA. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005;191:382–386.
38. McAdam AJ, Hasenbein ME, Feldman HA, Cole SE, Offermann JT, Riley AM, Lieu TA. Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. *J Infect Dis* 2004;190:20–26.

Resumen de los artículos

Propósito

En el año 2.001, el grupo holandés de Osterhaus describió un nuevo virus respiratorio, al que denominaron metapneumovirus humano, en niños con infecciones respiratorias. Otros grupos de investigadores de distintos países, comunicaron poco después pequeñas series de pacientes, compuestas fundamentalmente por niños hospitalizados, cuyos resultados apuntaban a que era una infección respiratoria eminentemente pediátrica, con una afectación clínica muy variable. En España únicamente se habían descrito 6 pacientes ambulatorios con una infección respiratoria leve.

Nuestro objetivo fue inicialmente investigar si el hMPV había circulado en España y, si así era, describir las características clínicas y epidemiológicas asociadas con su infección en niños hospitalizados. Posteriormente nuestro objetivo fue aumentar el nivel de confianza de nuestros hallazgos, ampliando el tamaño muestral y describiendo el comportamiento del virus cuando se detectaba como agente único, sin coinfección con otros virus respiratorios.

Pacientes y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, en el que se incluyeron todos los menores de dos años hospitalizados por alguna infección respiratoria en el Servicio de Pediatría del Hospital Severo Ochoa y cuyos padres consintieron en participar.

El período de estudio de la primera publicación comprendió tres temporadas epidemiológicas: 2.000/01, 2.0001/02 y 2.002/03. En la segunda publicación, se incluyeron las dos temporadas siguientes: 2.003/04 y 2.004/05. Se diseñó un cuestionario con variables clínicas y epidemiológicas, que se incorporó a la Historia Clínica de cada paciente,

de forma que los datos se fueron recogiendo a medida que iban ocurriendo (Figura 9).

Se recogieron aspirados nasofaríngeos en todos los casos, que fueron remitidos al Laboratorio de Gripe y Virus Respiratorios del Instituto de Salud Carlos III, donde se investigó la presencia de VRS A y B, influenza A, B y C y adenovirus mediante una RT-nested PCR múltiple. Así mismo se realizó otra RT-nested PCR múltiple para la detección de parainfluenza 1, 2, 3 y 4 y desde septiembre de 2.003, para rinovirus. La determinación de hMPV se realizó en una alícuota de las muestras previamente congelada a -80°C, mediante dos ensayos independientes de RT-PCR en dos genes diferentes.

Análisis estadístico

Todas las variables fueron introducidas en una base de datos y analizadas con el programa SPSS 11.0. Se evaluaron las diferencias entre los grupos mediante el test de Chi cuadrado o test exacto de Fisher, en el caso de proporciones, y el test de la T de Student en el caso de variables cuantitativas.

Resultados

En la primera publicación se incluyeron 748 niños menores de dos años. En 494 de ellos se detectó algún virus respiratorio. HMPV fue identificado en 69 (65,9%) pacientes, suponiendo el 14% de los casos con aislamiento positivo y el segundo virus más frecuente después del VRS.

En la segunda publicación fueron incluidos 1.322 niños menores de dos años, detectándose en el 70,5% algún virus respiratorio. La frecuencia de detección de hMPV fue, en esta muestra, de 10,8%. En este estudio, en el que se incluyó de forma rutinaria la PCR frente a rinovirus, hMPV fue el tercer virus en frecuencia, después de VRS y del propio rinovirus.

La circulación de hMPV no fue homogénea a lo largo de las 5 temporadas incluidas en el segundo estudio. Pudimos comprobar que la detección de hMPV fue especialmente prevalente durante la temporada 2.001/02, mientras que la temporada 2.004/2.005 fue en la que circuló con menor frecuencia.

Los meses de máxima incidencia de infección por hMPV fueron, en ambos estudios, los de primavera. Más del 80% de los niños eran menores de un año y los diagnósticos más frecuentes asociados con este virus fueron episodio recurrente de sibilancias (49,2%) y bronquiolitis (46,5%).

Se detectaron coinfecciones en el 26% y 29,7% respectivamente. No se encontraron diferencias significativas, en ninguno de los dos estudios, en cuanto a las características clínicas o gravedad del episodio entre las infecciones sencillas y las coinfecciones.

Se comparó el grupo de niños con infección sencilla por hMPV con un grupo de niños con infección sencilla por VRS, elegidos aleatoriamente entre la misma población de niños hospitalizados por infección respiratoria. En ambos estudios se encontraron diferencias en cuanto al diagnóstico y a la distribución estacional de ambos virus. Las infecciones por hMPV se asociaron más frecuentemente con episodio recurrente de sibilancias ($p=0,001$) y fueron más frecuentes en marzo y febrero, a diferencia de las infecciones por VRS que se diagnosticaron sobre todo en los niños con bronquiolitis, especialmente en diciembre y enero.

Ambos virus afectaron fundamentalmente a niños menores de 12 meses y aunque no se encontraron diferencias significativas en la edad media entre ambos grupos, la proporción de niños mayores de 6 meses fue mayor entre los infectados por hMPV ($p= 0,045$).

Conclusión

En nuestros estudios, se demuestra que hMPV ha circulado en España en las temporadas incluidas y que es uno de los virus respiratorios más frecuentes en los niños menores de dos años con infecciones respiratorias graves, que requieren ingreso hospitalario.

La manifestación clínica más frecuente en esta población es la infección de vías aéreas inferiores, especialmente en forma de episodio recurrente de sibilancias o de bronquiolitis. Las infecciones por hMPV son clínicamente indistinguibles de las asociadas a VRS.

Son frecuentes las coinfecciones con otros virus respiratorios, que no parecen conferir mayor gravedad al cuadro clínico.

Figura 9. Cuestionario clínico

IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE	
Fecha de Ingreso:	Fecha de alta (por causa respiratoria):
Género	Antecedentes Personales:
Prematuridad:	sem: EPC:
Atopia/ asma:	Otros:
A familiares 1º grado: ASMA/atopia:	
Temperatura máxima (aquí o en casa):	Duración de la fiebre:
SaO2 mínima:	Duración de la oxigenoterapia:
Tratamiento antibiótico: SI / NO	
Radiografía de tórax:	
Normal	Hiperinsuflación bilateral
Infiltrados perihiliares/peribronquiales	Infiltrado lobar
Infiltrado segmentario	Atelectasia
Derrame:	
Diagnóstico principal:	
Otros Diagnósticos:	
PRUEBAS COMPLEMENTARIAS:	
Hemograma:	
Hemocultivo:	Proteína C reactiva:
Otros:	
ASPIRADO NASOFARÍNGEO:	IF-HSO:
IF- INSTITUTO CARLOS III:	PCR:

EPC: enfermedad pulmonar crónica

IF: Inmunofluorescencia

HSO: Hospital Severo Ochoa

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena

Human Metapneumovirus Bronchiolitis in Infancy Is An Important Risk Factor for Asthma at Age 5

M.L. García-García, MD,^{1*} C. Calvo, PhD,¹ I. Casas, PhD,² T. Bracamonte, MD,¹ A. Rellán,¹ F. Gozalo,¹ T. Tenorio,¹ and P. Pérez-Breña, PhD²

Summary. Background Human metapneumovirus (hMPV) infection plays an important role in the pediatric respiratory infections. However, little is known about the relationship between hMPV-bronchiolitis and the development of subsequent wheezing. The aim of this study was to evaluate the outcome at third to fifth year after admission for hMPV-bronchiolitis and to compare it with children admitted for respiratory syncytial virus (RSV)-bronchiolitis and with children without lower respiratory disease in the first 2 years of life. Methods We studied 55 children (23 hMPV and 32 RSV acute bronchiolitis) aged 3–5 years and hospitalized during the seasons 2000–2005. Thirty-eight children admitted due to acute rotavirus gastroenteritis in the same seasons, and without bronchiolitis during infancy, were also analyzed. Clinical data were collected through structured clinical interviews at the follow-up visit. Skin prick tests to food and inhaled allergens were performed. Results Asthma was significantly more frequent in children with hMPV-bronchiolitis (odds ratio (OR) = 5.21), RSV-bronchiolitis (OR = 4.68), allergic rhinitis (OR = 1.7), and siblings with atopy (OR = 1.75). In the multivariate analyses, hMPV was the most important risk factor for asthma in preschool years (OR = 15.9), followed by RSV-bronchiolitis (OR = 10.1) and allergic rhinitis (OR = 4.9). No differences were found with respect to allergic rhinitis, atopic dermatitis, food allergy, proportion of positive prick tests, family history of atopy, and asthma. Conclusions hMPV-bronchiolitis in infancy was strongly associated with asthma as well as other forms of bronchial obstructive disease at third and fifth year of life. This association is, at least, as strong as the association observed with RSV infections. **Pediatr Pulmonol.** 2007; 42:458–464.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: human metapneumovirus; respiratory syncytial virus; infants; children; asthma; wheezing.

INTRODUCTION

Human metapneumovirus (hMPV), recently described in The Netherlands,¹ plays an important role in the pediatric respiratory infections. After the initial report, many articles have been published in Europe,^{2–10} America,^{11–19} Asia,^{20,21} Africa,²² and Australia²³ describing hMPV infected patients. Our group has recently published one of the largest pediatric series of hMPV acute respiratory infections.^{10,24,43} Most studies have been performed in hospitalized patients and data show that this virus is more prevalent among pediatric patients, specially in those with bronchiolitis or recurrent wheezing.^{25,26} However, little is known about the relationship between hMPV-bronchiolitis and the development of subsequent wheezing. The increased prevalence of asthma after hospital admission for wheezing in early childhood is well documented in many studies, being the respiratory syncytial virus (RSV) the most frequently implicated.^{27–30} Recent studies support the hypothesis that bronchiolitis by other types of viruses may also be associated with recurrent wheezing or asthma. Data from Lemanske et al.³¹ showed that prevalence of wheezing at the age of 3 years is most significantly associated with

infections by infantile rhinovirus. However, the long-term effect of hMPV on lung function and symptoms in later childhood is not yet fully investigated.

The primary aim of this study was to evaluate the airway symptoms at third and fifth year of life of children hospitalized for early-life hMPV-bronchiolitis, compared with those hospitalized with RSV-bronchiolitis and with

¹Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital, Madrid, Spain.

²Virology Service, Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, National Center of Microbiology, ISCIII, Madrid, Spain.

Grant sponsor: 98/0310 of Spain's "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (Health Research Fund).

*Correspondence to: M.L. García-García, Servicio de Pediatría, Hospital Severo Ochoa, Avenida Orellana s/n, Leganés, 28911, Madrid, Spain. E-mail: marialuzgarcia@terra.es

Received 26 November 2006; Revised 29 January 2007; Accepted 30 January 2007.

DOI 10.1002/ppul.20597

Published online 11 April 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

controls without lower respiratory disease in the first 2 years of life.

PATIENTS AND METHODS

Participants and Inclusion Criteria

Inclusion criteria were children of more than 2 years of age with a previous history of hospitalization at the age 0–24 months due to hMPV-bronchiolitis for the index group, RSV-bronchiolitis for the RSV group, and gastroenteritis for rotavirus for the control group.

A total of 1,322 children were hospitalized at age ≤ 24 months due to respiratory infections between October 1, 2000 and June 1, 2005 at the Department of Pediatrics, Severo Ochoa Hospital, Madrid, Spain. At least one respiratory virus was detected in 933 samples (70.5%). Out of these positive samples, 599 (64.2%) were RSV, and 101 (10.8%) were hMPV. Thirty of the 101 hMPV infections were co-infections (29.7%) and were excluded. Twenty other children were excluded due to previous history of wheezing episodes. Twenty-four out of the 51 remaining patients were older than 2 years when the study was performed. One hMPV child had died accidentally and therefore, 23 hMPV children were finally included.

A random sample of 88 RSV-infected infants was selected from the same population of hospitalized infants with respiratory infection. Sixty-two of them were diagnosed of bronchiolitis and 32 could be finally contacted and included. Simple random sampling was performed using Excel data analysis function.

A random sample of 90 infants with history of admission due to acute rotavirus gastroenteritis in the first 2 years of life was selected from 600 admissions with this diagnosis during the same seasons. Sixty-eight could be contacted. Thirty-eight of them were excluded due to concurrent history of asthma or wheezing in their first 24 months of life.

hMPV was identified by two RT-PCR assays described previously by our group.³² The RSV etiology of infection was confirmed by immunofluorescence and RT-PCR.

Structured Clinical Interview at the Follow-Up Visit

Parents were contacted by phone from October 2005 to December 2005, and were invited to a follow-up visit. Informed consent was obtained from each of the parents or legal guardians. A clinical interview based on a structured questionnaire was performed by three of the authors in the study (M.L.G, C.C, TB) in order to obtain information on wheezing episodes or related hospital admissions and occurrence of asthma, or physician-diagnosed atopic dermatitis, allergic rhinitis, food allergy, use of bronchodilators and maintenance medication for asthma. Information on pet contacts, parental smoking habits, presence of allergy, eczema, and asthma in first order family members (mother, father, or siblings) that had been

diagnosed by a medical doctor was also recorded. The researchers were not blinded to the status of the child when the interviews were performed.

Primary care pediatricians were also contacted by phone and asked for reviewing electronic patients records in order to confirm the presence of wheezing episodes, its number, and the use of bronchodilator and maintenance medication prescription for asthma. Only the information confirmed by the pediatrician in charge of the patient was taken into account.

For the estimation of allergic sensitization, skin prick tests for common food (egg and cow's milk), and inhaled allergens (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, grass pollen mix, dog, and cat) were performed. Standardized extracts were used. All extracts were from Abelló^R. Histamine (0.1%) in phosphate-buffered saline and physiologic saline were used as positive and negative controls, respectively. Three study nurses performed all of the tests. Children were advised not to take antihistaminic medication for 1 week before the test. Commercially available lancets were used to prick the epidermis with the allergen extract drops. The tests were read at 15 min, and mean wheal diameters were calculated (sum of the longest diameter and its perpendicular one divided by two). A mean wheal diameter of at least 3 mm greater than the negative control was taken as positive.

Clinical Definitions

All the classic criteria, present in an initial episode of acute onset expiratory dyspnea with previous signs of viral respiratory infection (whether or not this was associated to respiratory distress or pneumonia) were applied in diagnosing *bronchiolitis*.³³

The term *recurrent wheezing* was used to imply asthma or one or two episodes of wheezing verified by a physician.

Asthma was defined as at least three episodes of bronchial obstruction verified by a physician.³⁴

Allergic rhinitis was defined as rhinitis appearing at least twice after exposure to a particular allergen and unrelated to infection.

Statistics

Data were analyzed with the use of SPSS 11.0. Comparability between the groups was assessed with the χ^2 test for proportions. When analyzing the proportional differences among the three groups, an overall χ^2 test was analyzed first, and if the *P*-value was <0.05 , further paired analyses were made applying the so-called Bonferroni correction. Two-tailed *t*-tests were used in all analyses. The multivariate backward stepwise logistic regression model was used to calculate the adjusted risk ratios (RR) with 95% confidence intervals for estimating the association between different factors and asthma.

TABLE 1—Evaluation of Background Factors in 23 Children With hMPV-Bronchiolitis, 32 Children With RSV-Bronchiolitis, and 30 Control Children

Background factor	hMPV group	RSV group	Control group	P-value*
Age bronchiolitis (days) ¹	140 ± 130	122 ± 133	—	0.63
Actual age (years) ¹	3.7 ± 0.92	4.03 ± 0.65	3.90 ± 0.61	0.33
Male sex	14(60.9%)	17(53.1%)	13(43.3%)	0.44
Prematurity	9(39.1%)	6(18.8%)	3(10%)	0.03
Asthma				
Mother	6(26.1%)	6(18.8%)	6(20%)	0.79
Father	3(13%)	5(15.6%)	4(13.3%)	0.95
Siblings	8(34.8%)	5(15.6%)	4(13.3%)	0.11
Atopy				
Mother	7(30.4%)	13(40.6%)	6(20.7%)	0.24
Father	6(26.1%)	4(12.5%)	5(16.7%)	0.42
Siblings	6(26.1%)	11(34.4%)	3(10%)	0.07
Smoking				
Mother	7(31.8%)	21(65.6%)	12(40%)	0.02
Father	8(36.4%)	18(56.3%)	10(33.3%)	0.14
Indoor furred pets	7(31.8%)	8(25%)	13(43.3%)	0.30

¹Mean ± standard deviation.*P-value: overall χ^2 test to analyze proportional differences among the three groups.

RESULTS

All children were older than 2 years. Fourteen(60.8%) hMPV patients, 26(81.2%) RSV patients, and 29(76.6%) control children were in their fifth year of life at the moment the study was started.

The basic characteristics of the 85 included children are presented in Table 1. The hMPV, the RSV, and the control groups were similar for 9 out of 11 background factors, including the family history of atopy and asthma. There were significant differences among the three groups in two factors: smoking by the mother was more frequent in RSV patients versus hMPV and control group ($P = 0.01$) and prematurity was more frequent in hMPV patients versus RSV and control group ($P = 0.01$). However, only one hMPV patient required mechanical ventilation in the neonatal period.

No differences were found among groups regarding allergic rhinitis, atopic dermatitis, or food allergy (Table 2). Fourteen parents (46.7%) in the control group refused prick test performance versus 4(17.4%) in the

hMPV group and 1(3.2%) in the RSV group ($P = 0.001$). However, when the tests were done, similar proportion of positive results were found in the three groups. In contrast, the frequency of recurrent wheezing and asthma was significantly higher for the hMPV and RSV group when compared with control group (Table 2). hMPV children (52.2%) presented wheezing in the third year of age versus 50% of RSV children and 16.7% of the control group, $P = 0.008$. Similar results were obtained in the fifth year of age: 64% of hMPV children presented wheezing versus 38% of RSV children and 21.7% in the control group, $P = 0.035$. Five of the hMPV children and five of the RSV children required hospital admission related to asthma, whereas none of the controls needed hospitalization ($P = 0.03$). Significantly more hMPV and RSV children received preventive antiasthmatic treatment (inhaled corticosteroids and leukotrienes antagonists) than children in control group.

Several possible hereditary and environmental factors for the development of different bronchial obstructive symptoms were evaluated using Fisher's exact test

TABLE 2—Number of Children With Atopic Dermatitis, Allergic Rhinitis, Food Allergy, Allergic Sensitization, and Bronchial Obstructive Symptoms in the hMPV, RSV-Bronchiolitis, and Control Group

	hMPV group	RSV group	Control group	P-value
Atopic dermatitis	10(43.5%)	11(34.4%)	11(36.7%)	0.78
Allergic rhinitis	5(21.7%)	7(21.9%)	5(16.7%)	0.85
Food allergy	1(4.3%)	2(6.3%)	2(6.7%)	0.93
Prick test positivity	8(42.1%)	8(26.7%)	6(37.5%)	0.50
Recurrent wheezing	20(87%)	24(75%)	12(40%)	0.001
Asthma	16(69.6%)	20(62.5%)	4(13.3%)	<0.001
Asthma admissions	5(21.7%)	5(15.6%)	0	0.036
Antiasthmatic Treatment	7(30.4%)	10(31.3%)	2(6.7%)	0.031

TABLE 3—Univariate Test of Various Possible Risk Factors for third and fifth Year Recurrent Wheezing

Risk factor	Recurrent wheezing third year			Recurrent wheezing fifth year		
	<i>P</i> -value	OR	95% CI	<i>P</i> -value	OR	95% CI
hMPV-bronchiolitis	0.008	3.1	1.28, 7.62	0.015	2.9	1.24, 7.04
RSV-bronchiolitis	0.007	3.0	1.25, 7.17	0.23	1.7	0.70, 4.41
Prematurity	0.054	1.8	1.12, 3.07	0.022	3.0	1.46, 6.13
Atopic dermatitis	0.82	1.0	0.62, 1.85	0.33	1.6	0.72, 3.76
Allergic rhinitis	0.093	1.7	1.03, 2.92	<0.001	4.6	2.07-10.31
Positive pricktest	0.80	1.0	0.63, 1.82	0.28	1.7	0.73, 3.97
Male sex	0.63	0.87	0.51, 1.49	0.49	0.8	0.46, 1.37
Asthma mother	0.59	1.1	0.65, 2.17	0.42	1.6	0.66, 3.92
Asthma father	1.0	1.0	0.52, 2.25	0.68	1.2	0.46, 3.52
Smoking						
By father	1.00	0.9	0.45, 1.84	0.68	1.2	0.46, 3.52
By mother	0.28	0.6	0.32, 1.33	0.34	1.7	0.64, 4.68
Furred animals	0.23	0.6	0.33, 1.23	1.00	1.1	0.46, 2.74

(Table 3). The risk of wheezing during the third year of age was greatly increased for children with hMPV-bronchiolitis (odds ratio (OR) = 3.1; 95% CI 1.28, 7.62); RSV-bronchiolitis (OR = 3; 95% CI 1.25, 7.17); prematurity (OR = 1.8; 95% CI 1.12, 3.07); and allergic rhinitis (OR = 1.7; 95% CI 1.03, 2.92). Similarly hMPV-bronchiolitis (OR = 2.9; 95% CI 1.24, 7.04); prematurity (OR = 3.0; 95% CI 1.46, 6.13); and allergic rhinitis (OR = 4.6; 95% CI 2.07, 10.3) were significantly associated to wheezing during the fifth year of age. The frequency of recurrent wheezing at 5 years was higher for the RSV group (38%) than for the control group (21.7%), but the difference was not statistically significant (OR = 1.7; 95% CI 0.70, 4.41).

Asthma development was significantly more frequent in children with history of hMPV-bronchiolitis, RSV-bronchiolitis, allergic rhinitis, and siblings with atopy in the univariate analysis (Table 4). The age of onset of bronchiolitis was not associated with later asthma.

The risk factors in Table 4 with a *P*-value <0.10 were entered in backward (LR) stepwise logistic regression analysis to estimate which factors were independently related to the development of asthma. Moreover, two possible confounding factors were included: prematurity, as it was more frequent in hMPV patients, and smoking by mother, more frequent in RSV patients. hMPV-bronchiolitis was the most important independent risk factor for asthma (OR = 15.9; CI 3.6, 70.5), followed by RSV-bronchiolitis (OR = 10.1; CI 2.5, 40.1), and allergic rhinitis (OR = 4.9; CI 1.2, 19.9). Sibling history of atopy was more frequent in asthmatic patients than in controls, but did not reach statistical significance in the multivariate analyses (Table 5).

DISCUSSION

Several studies have demonstrated an association between RSV-bronchiolitis in early childhood with a

TABLE 4—Univariate Test of Various Possible Risk Factors for Asthma

	N (%)	<i>P</i> -value	OR	95% CI
Male sex	22(48.9)	0.67	1.1	0.73, 1.64
hMPV-bronchiolitis	16(40)	<0.001	5.21	2.01, 13.51
RSV-bronchiolitis	20(50)	<0.001	4.68	1.81, 12.13
Prematurity	11(27.5)	0.19	1.4	0.89, 2.23
Atopic dermatitis	14(35)	0.66	0.8	0.55, 1.44
Allergic rhinitis	12(30)	0.05	1.7	1.12, 2.60
Food allergy	4(10)	0.18	1.7	1.07, 2.93
Positive pricktest	13(36)	0.79	1.1	0.70, 1.72
Asthma mother	11(27.5)	0.19	1.4	0.89, 2.23
Asthma father	5(12.5)	0.76	0.86	0.42, 1.76
Atopy mother	14(35)	0.48	1.20	0.76, 1.89
Atopy father	7(17.5)	1	0.99	0.54, 1.79
Sibling atopy	14(35)	0.023	1.75	1.15, 2.64
Smoking				
By father	21(52.5)	0.12	1.4	0.94, 2.30
By mother	20(50)	0.82	1.1	0.70, 1.72
Furred animals	12(30)	0.64	0.85	0.51, 1.41

TABLE 5—Multivariate Test of Possible Risk Factors for Asthma by a Backward (LR) Stepwise Logistic Procedure in 85 Children, 23 of Whom Had hMPV-Bronchiolitis, and 32 RSV-Bronchiolitis

Risk factor	Asthma		
	<i>P</i> -value	OR	95% CI
hMPV-bronchiolitis	<0.001	15.9	3.6, 70.5
RSV-bronchiolitis	0.001	10.1	2.5, 40.1
Allergic rhinitis	0.026	4.9	1.2, 19.9
Prematurity	0.986	0.988	0.3, 3.8
Siblings with atopy	0.091	2.87	0.8, 9.7
Smoking by mother	0.882	1.0	0.4, 3.3

subsequent increased risk of recurrent wheezing and asthma.^{35–38} We confirmed previous studies linking RSV-bronchiolitis severe enough to require hospitalization, with the development of asthma. Most importantly, the present study showed, by the first time to our knowledge that an early hMPV infection during infancy is one of the most significant independent risk factors for the development of pre-school asthma. The prevalence of asthma in children with an episode of acute hMPV-bronchiolitis of sufficient severity to require hospital admission was over five times that of the control group (OR = 5.2). Similar proportion of asthma was found in infants with RSV-bronchiolitis (OR = 4.68). The ORs for recurrent wheezing at 3 and 5 years of age were also raised at 3.1 and 2.9, respectively, in the hMPV group.

There was no clear evidence that the children who had hMPV-bronchiolitis came from families with an increased incidence of wheezing attacks or history of atopic tendency. Sibling atopy was a risk factor for asthma in the univariate analyses, but could not be confirmed in the multivariate analyses. Skin tests also failed to show that the index group had an increased incidence of personal atopy, which might explain the tendency to more frequent development of asthma and recurrent wheezing. However, allergic rhinitis was independently associated with asthma development.

Previous articles studying the relationship between RSV-bronchiolitis and asthma present contradictory results. Sigurs et al.²⁸ found that family history of asthma has a relationship with the development of wheezing but not with the development of asthma. In the same study, family history of atopy was a risk factor for allergic sensitization but not for asthma. The relatively small sample of our study should be taken into consideration because with a higher sample, the familiar history of atopy might reach statistical significance as an independent risk factor.

Smoking in the family was not a risk factor for bronchial obstructive symptoms at this follow-up. Similarly, no difference in smoking habits in the family was found between the index and the control group neither in

the study by Murray et al.³⁹ nor in the study by Sigurs et al.²⁸

One problem when asthma is evaluated in early childhood is the use of wheezing as an outcome measure. This method has been criticized because of its subjectivity and the lack of consistency between parents' and clinicians' reports of wheezing and asthma.⁴⁰ It is also difficult to define asthma in preschool children. We employed the definition previously used by Sigurs et al.²⁸: at least three episodes of bronchial obstruction verified by a medical doctor.

Considering only the episodes confirmed by a medical doctor increases the reliability of data related with wheezing although the design of the study is not prospective from the initial episode of bronchiolitis.

Most epidemiologic studies have mainly focused on the association of RSV infections in early life with the subsequent development of wheezing or asthma. Lately, the development of sensitive molecular diagnosis tests has allowed us to evaluate the role of other respiratory viruses in this pathology. Lemanske et al.³¹ have recently evaluated the contribution of RSV and rhinovirus infections during infancy to the development of subsequent wheezing in early childhood. They found that moderate-severe rhinovirus wheezing illness in infancy was the most significant risk factor for the development of preschool wheezing (OR = 10). Children with antecedents of RSV related moderate to severe wheezing illnesses also had a higher risk of developing asthma but to a lesser extent than those with rhinovirus infections (OR = 3). Similar results were found by Korppi and coworkers⁴¹ in a follow-up study of 89 infants below 2 years of age, hospitalized for infection associated with wheezing and evaluated 3 years later. In this study, the wheezing patients with RSV infection had a much better prognosis than those without it. In a previous study, Korppi et al.⁴² showed that early childhood wheezing with other than RSV aetiology, followed by early childhood wheezing with RSV aetiology, seemed to carry the highest risk for asthma. These results suggest that the risk developing asthma after an initial bronchiolitis episode in infancy could be different depending on the type of viral infection present during bronchial obstruction. However, the association between viral bronchiolitis and asthma development does not imply necessarily a causal relationship. So, it is possible that the children who develop wheezing/asthma are genetically predetermined to do so, and they might develop severe respiratory disease due to whatever respiratory virus they encounter early in life, whether it is hMPV, RSV, or rhinovirus. Further studies are needed to clarify this important issue.

hMPV is a recently described virus which seems to play a significant role in lower respiratory tract infections in infants. In a previous study of our group, hMPV accounted for 10% of positive isolates from hospitalized infants.⁴³

The most frequent diagnoses were bronchiolitis and recurrent wheezing. In comparison with children with RSV-induced bronchiolitis, children with hMPV-bronchiolitis were of the same age and did not have a more severe disease course during their acute infection. The study conducted by Rawlinson et al.⁴⁴ attributed a limited role to hMPV in asthma exacerbations in children, but other studies found that hMPV was related to asthma exacerbations and wheezing in the pediatric population.^{2,6,20,45} Our data suggest that hMPV infections might be associated not only with acute exacerbations in asthmatic children but also with the development of asthma in the medium term. However, the best study to confirm the association between specific viral infection and asthma development with less confounding factors would be a prospective study in which the children are recruited at birth and followed for any respiratory tract infections during the first years of life.

Although the nature of the association between hMPV and the respiratory long-term-consequences remains to be determined, several published observations provide some insight.

Acute hMPV infection in mice is associated with long-term pulmonary inflammation that leads to significant obstructive disease of the airways.⁴⁶ Primary hMPV infection elicits weak, innate, and aberrant adaptive immune responses characterized by induction of a Th2-type cytokine response at later stages of infection that coincides with increased interleukin-10 expression and persistent virus replication in the lung. These features are consistent with virus persistence and indicate that the immune response to hMPV is unique compared to the immune response to RSV.⁴⁷

One important information that is often lacking in previous studies that investigate the connection between bronchiolitis and bronchial obstructive symptoms is whether some of the children have experienced wheezing before the bronchiolitis.⁴⁸ If this data is missing, there is the possibility that this infection is not the first wheezing episode. In order to avoid this confusion, we only included children with their first wheezing episode.

In conclusion, hMPV-bronchiolitis in infancy was strongly associated with asthma as well as other forms of bronchial obstructive disease at third and fifth year of life. This association is, at least, as strong as the association observed with RSV infections.

REFERENCES

1. Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719–724.
2. Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360:1393–1394.
3. Freymouth F, Vabret A, Legrand L, Etteradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guillois B. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:92–94.
4. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:3043–3045.
5. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Ragazzo V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infant in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:2987–2991.
6. Døllner H, Risnes K, Radtke A, Nordbo SA. Outbreak of human metapneumovirus infection in Norwegian children. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:436–440.
7. Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, Constantopoulos AG, Kafetzis D, Papadopoulos NG. Human Metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol* 2004;30:267–270.
8. von Linstow ML, Henrik Larsen H, Eugen-Olsen J, Koch A, Nordmann Winther T, Meyer AM, Westh H, Lundgren B, Melbye M, Høgh B. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in hospitalized Danish children with acute respiratory tract infection. *Scand J Infect Dis* 2004;36:578–584.
9. König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* 2004;42:4632–4635.
10. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Martin F, Perez-Brena P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain. *Arch Dis Child* 2006;91:290–295.
11. Peret T, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, Erdman DD, Anderson LJ. Characterization of human metapneumovirus isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002;185:1660–1663.
12. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, Peret TC, Erdman DD, Anderson LJ. Virological characteristics and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: A new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;186:1330–1334.
13. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: Clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003;111:1407–1410.
14. Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1626–1628.
15. Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, Bergeron MG, Dery P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:634–640.
16. Williams J, Harris P, Tollefson S, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;350:443–450.
17. Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarria M, Carballed G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* 2004;72:299–303.
18. Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, Edwards K, Hall CB, Walker FJ, Iwane M, Anderson LJ. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2004;10:700–705.
19. McAdam AJ, Hasenbein ME, Feldman HA, Cole SE, Offermann JT, Riley AM, Lieu TA. Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. *J Infect Dis* 2004;190:20–26.

20. Peiris J, Tang W-H, Chan K, Khong PL, Guan Y, Lau YL, Chiu SS. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2003;9:628–633.
21. Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Murakami T. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol* 2006;35:394–399.
22. Ijpma FF, Beekhuis D, Cotton MF, Pieper CH, Kimpen JL, van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Osterhaus DM. Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *J Med Virol* 2004;73:486–493.
23. Nissen MD, Siebert DJ, Mackay IM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust.* 2002;176:188.
24. García García ML, Calvo Rey C, Martín del Valle F, López Huertas MR, Casas Flecha I, Díaz-Delgado R, Pérez-Brena P. Respiratory infections due to metapneumovirus in hospitalized infants. *An Pediatr (Barc)* 2004;61:213–218.
25. Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360:1393–1394.
26. Williams JV, Tollefson SJ, Heymann PW, Carper HT, Patrie J, Crowe JE. Human metapneumovirus infection in children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1311–1312.
27. Henry RL, Hodges IGC, Milner AD, Stokes GM. Respiratory problems 2 years after acute bronchiolitis in infancy. *Arch Dis Child* 1983;58:713–716.
28. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kellman B. Respiratory Syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1501–1507.
29. Sigurs N, Gustafsson P, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:137–141.
30. Respiratory morbidity 20 years after RSV infection in infancy. *Pediatr Pulmonol* 2004;38:155–160.
31. Lemanske RF, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, Kirk CJ, Reisdorf E, Roberg KA, Anderson EL, Carlson-Dakes KT, Adler KJ, Gilbertson-White S, Pappas TE, Dasilva DF, Tisler CJ, Gern JE. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *Allergy Clin Immunol* 2005;116:571–577.
32. López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, García-García ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005;129:1–7.
33. McConnochie K. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child* 1983;137:11–13.
34. Third International Pediatric Consensus statement on the management of childhood asthma. Warner JO, Naspitz CK, Cropp G. *Pediatric Pulmonol* 1998;25:1–17.
35. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: A prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* 1995;95:500–505.
36. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 29.
37. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, Wright AL, Martinez FD. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354: 541–545.
38. Noble V, Murray M, Webb M, Alexander J, Swarbrick A, Milner A. Respiratory status and allergy nine to 10 years after acute bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1997;76:315–319.
39. Murray M, Webb M, O'Callaghan C, Swarbrick A, Milner A. Respiratory status and allergy after bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1992;67:482–487.
40. Cane Rs, Ranganathan SC, McKenzie SA. What do parents of wheezy children understand by “wheeze”? *Arch Dis Child* 2000; 82:327–332.
41. Reijoonen TM, Kotaniemi-Syrjanen A, Korhonen K, Korppi M. Predictors of asthma three years after hospital admission for wheezing in infancy. *Pediatrics* 2000;106:1406–1412.
42. Korppi M, Kuikka L, Reijonen T, Remes K, Juntunen-Backman K, Launiala K. Bronchial asthma and hyperreactivity after early childhood bronchiolitis and pneumonia, an 8-year follow-up study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994;148:1079–1084.
43. García-García ML, Calvo C, Pérez-Breña P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatr Pulmonol* 2006;41:863–871.
44. Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis* 2003;187:1314–1318.
45. Bosis S, Esposito S, Niersters HG, Crovari P, Osterhaus AD, Principi N. Impact of human metapneumovirus in childhood: Comparison with respiratory syncytial virus and influenza virus. *J Virol* 2004;75:101–1044.
46. Hamelin ME, Prince GA, Gomez AM, Kinkead R, Boivin G. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* 2006;193:1634–1642.
47. Alvarez R, Tripp RA. The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunity and impaired virus clearance in BALB/c mice. *J Virol* 2005;79:5971–5978.
48. Sigurs N. A cohort of children hospitalised with acute RSV bronchiolitis: Impact on later respiratory disease. *Pediatr Respir Rev* 2002;3:177–183.

Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5.

García-García ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellán A, Gozalo F, Tenorio T, Pérez-Breña P.
Pediatr Pulmonol 2007;42:458-64.

Pediatric Pulmonology es una de las revistas de mayor prestigio y difusión en el campo de la Neumología pediátrica.

Resumen del artículo

Propósito

Tras nuestras publicaciones acerca de hMPV y las de otros autores internacionales, pudimos comprobar por un lado, que este nuevo virus era frecuente en los lactantes ingresados por un primer episodio de bronquiolitis y por otro, que las manifestaciones clínicas en el momento agudo de la infección eran muy similares a las asociadas a la infección por VRS. La siguiente cuestión que se planteó fue la de si además de estas similitudes en el momento agudo, hMPV podría compartir también alguna característica asociada a la infección por VRS a largo plazo, como es el desarrollo de enfermedad reactiva de la vía aérea. Aunque varios autores habían planteado esta posibilidad, no se había publicado ningún trabajo encaminado a esclarecer este punto. En cambio, sí se habían publicado algunos estudios que parecían demostrar que el papel clásicamente atribuido al VRS como facilitador o inductor de la aparición de asma tras un primer episodio de bronquiolitis, no era exclusivo de este virus. Por el contrario, otros virus como rinovirus parecen asociarse también de una forma muy significativa con el desarrollo posterior de asma o sibilancias recurrentes tras una primera infección en los primeros meses de la vida.

Por todo ello, nos planteamos un estudio cuyo objetivo principal era determinar si el hecho de padecer una bronquiolitis grave por hMPV en los dos primeros años de la vida, se asocia con mayor riesgo de episodios recurrentes de sibilancias a la edad de 3 y 5 años. Además nos propusimos comparar este riesgo con el de los niños con antecedente de bronquiolitis grave por VRS y con el de los niños sin ningún episodio de sibilancias en los primeros dos años de vida.

Pacientes y métodos

Se incluyeron los niños que en el momento de iniciar el estudio, eran mayores de dos años y que en los dos primeros años de vida habían tenido alguno de los siguientes antecedentes:

- *Hospitalización por bronquiolitis por hMPV como infección única* (sin coinfecciones), entre el 1 de octubre del año 2.000 y el 1 de junio de 2.005, para el grupo índice.

De 101 niños con infección por hMPV en los dos primeros años, se excluyeron 30 por detectarse coinfección con algún otro virus respiratorio. Otros 20 niños se excluyeron por haber presentado algún episodio de sibilancias previo al ingreso. De los 24 niños restantes, que cumplían todos los criterios de inclusión, uno había fallecido accidentalmente por lo que la población de estudio para este grupo, estuvo compuesta finalmente por 23 niños. Se consiguió contactar con todos ellos.

- *Hospitalización por bronquiolitis por VRS como infección única* (sin coinfecciones), entre el 1 de octubre del año 2.000 y el 1 de junio de 2.005, para el grupo de comparación con VRS.

Se eligió una muestra aleatoria de 88 pacientes con infección sencilla por VRS, de los cuales 62 habían sido diagnosticados de bronquiolitis. Se pudo contactar con 32 de ellos.

- *Hospitalización por gastroenteritis por rotavirus y ausencia de cualquier episodio de sibilancias en los dos primeros años de vida*, para el

grupo control. Se eligió una muestra aleatoria de 90 niños de un total de 600 ingresos con ese diagnóstico en el mismo período de tiempo. Se pudo contactar con 68 de ellos. Treinta y ocho fueron excluidos por haber presentado algún episodio de sibilancias en los dos primeros años de vida. Finalmente se incluyeron 30 casos.

Se contactó con todos los padres entre octubre y diciembre de 2.005 y se les invitó a participar en el estudio, firmando un consentimiento informado en caso de aceptar la inclusión.

Se diseñó un cuestionario orientado a obtener información en la entrevista con los padres, acerca de la presencia de episodios de sibilancias posteriores a la bronquiolitis, su frecuencia, la necesidad de hospitalización por este motivo y la necesidad de tratamiento broncodilatador y de mantenimiento para los síntomas respiratorios recurrentes. Además se recogió información acerca del tabaquismo pasivo, la presencia de animales en el domicilio y los antecedentes de alergia, dermatitis atópica o asma en algún familiar de primer grado, diagnosticados por un médico.

Se contactó telefónicamente con los pediatras de Atención Primaria de los pacientes incluidos, para confirmar todos los datos relacionados con la frecuencia y gravedad de los episodios de sibilancias.

Para estimar la frecuencia de sensibilización alérgica se realizó, en los casos en que los padres consintieron, prick test a los alérgenos alimentarios y neumoaérgenos más comunes.

Análisis estadístico

Todas las variables fueron introducidas en una base de datos y analizadas con el programa SPSS 11.0. Se evaluaron las diferencias entre los grupos mediante el test de Chi cuadrado o test exacto de Fisher, en el caso de proporciones y test de t de Student en el caso de variables cuantitativas. Se construyó un modelo de regresión logística explicativo,

incluyendo las variables que en el análisis univariado tenían una $p < 0,25$, más aquellas que presentaban interacción o confusión.

Resultados

La frecuencia de episodios recurrentes de sibilancias y de asma a los 3 años de edad, fue significativamente mayor en los grupos hMPV (52,2%) y VRS (50%) en comparación con el grupo control (16,7%) ($p = 0,008$). Resultados similares se obtuvieron a los 5 años. Igualmente, las hospitalizaciones relacionadas con el asma también fueron más frecuentes en el grupo hMPV (21,7%) y VRS (15,6%), que en el grupo control (0%) ($p = 0,036$). Lo mismo se observó con el uso de medicación de mantenimiento antiasmática: hMPV (30,4%), VRS (31,3%) y grupo control (6,7%) ($p = 0,031$).

Las variables que en el análisis univariado se asociaron significativamente con el desarrollo de sibilancias recurrentes a los 3 años fueron: bronquiolitis por hMPV ($p = 0,008$) y por VRS ($p = 0,007$), prematuridad ($p = 0,054$) y rinitis alérgica ($p = 0,093$). En cambio, a los 5 años la bronquiolitis por VRS ($p = 0,23$) ya no se asoció con sibilancias recurrentes, aunque sí lo hizo la bronquiolitis por hMPV ($p = 0,015$). En el análisis multivariante, el antecedente de bronquiolitis por hMPV fue el factor de riesgo independiente más importante para el desarrollo de asma (Odds Ratio:4,9; IC 95: 1,2-19,9).

Conclusión

La bronquiolitis por hMPV se asocia de forma significativa con el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes al tercer y quinto año de vida. Esta asociación es, al menos, tan intensa como la observada tras las infecciones por VRS.

High incidence of human bocavirus infection in children in Spain.

Pozo F, García-García ML Calvo C, Cuesta I Pérez-Breña P,
Casas I

J Clin Virol 2007; 40(3):224-8

Journal of Clinical Virology es una publicación internacional de prestigio, especialmente dedicada a la difusión de artículos de investigación relacionados con la Virología humana.

Human bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection.

García-García ML, Calvo C, Pozo F, Pérez-Breña P, Quevedo S,
Bracamonte T, Casas I.

Pediatr Infect Dis J. 2008;27(4):358-60

The Pediatric Infectious Disease Journal es la publicación oficial de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas Pediátricas de la Academia Americana de Pediatría y la revista de mayor prestigio en su campo

Detection of human bocavirus in ill and healthy Spanish children. A 2-year study

García-García ML, Calvo C, Pozo F, Pérez-Breña P, Vázquez MC, Casas I

Archives Disease of Childhood (*In press*)

Archives of Disease in Childhood es el órgano de difusión del *Royal College of Paediatrics and Child Health* Británico y una de las revistas con mayor difusión y prestigio en la Pediatría mundial.

Clinical characteristics of human bocavirus infections in Spanish children compared with other respiratory viruses

Calvo C, García-García ML, Pozo F, Carvajal O, Pérez-Breña P, Casas I

Pediatric Infectious Disease Journal 2008 Jun 19 (Epub ahead of print)

The Pediatric Infectious Disease Journal es la publicación oficial de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas Pediátricas de la Academia Americana de Pediatría y la revista de mayor prestigio en su campo

High incidence of human bocavirus infection in children in Spain

Francisco Pozo^{a,b,*}, Mari Luz García-García^c, Cristina Calvo^c,
Isabel Cuesta^a, Pilar Pérez-Breña^a, Inmaculada Casas^{a,b}

^a Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, National Center of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain

^b Alert and Emergence Unit, National Center of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain

^c Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital, Leganés, Spain

Received 10 April 2007; received in revised form 25 July 2007; accepted 20 August 2007

Abstract

Background: The newly identified human bocavirus (HBoV), a member of the *Parvoviridae* family, has been associated to low respiratory tract infections in young children.

Objectives: To present the epidemiological profile and the main clinical characteristics showed by children infected with this virus in Spain.

Study design: We have studied the incidence of HBoV and other 15 respiratory viruses in 917 nasopharyngeal aspirates taken from 730 infants and children under age of 14 with acute lower respiratory tract infection from September-04 to August-06.

Results: HBoV was detected in 123 samples (13.4%) showing a seasonal distribution with November and December as the peak months. Out of the 558 samples which rendered a positive result for at least one of the virus tested, HBoV (22%) ranked fourth behind respiratory syncytial virus (181, 32%), adenoviruses (155, 28%) and rhinoviruses (136, 24%). Co-infections with HBoV and other respiratory viruses were detected in 74 out of 123 HBoV-positive specimens (60%). In addition, HBoV was also found in stool and, for the first time, in urine samples.

Conclusions: Results obtained provide further evidence that HBoV is involved in acute lower respiratory tract infections. HBoV-associated disease should not be limited to the respiratory tract.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Parvoviridae*; Bronchiolitis; Pneumonia; Wheezing; Stool samples; Respiratory infection

1. Introduction

Acute lower respiratory tract infection (LRTI) refers unspecifically to infections of lower airways, either with intrapulmonary shunt (bronchitis and pneumonia) or with dynamic hyperinflation (bronchiolitis and wheeze). Respiratory syncytial virus (RSV) is clearly the major pathogen associated with LRTI during infancy and early childhood. However, parainfluenza viruses (PIV), rhinoviruses, adenoviruses, coronaviruses and influenza viruses are also

common known causative agents of LRTI in infants and children. Even so, a specific etiologic agent is often not identified in clinical practice because of lack of sensitive tests for all known agents and the presence of yet unrecognized pathogens. The recently discovered human metapneumovirus (hMPV) and human coronavirus NL63 have contributed to resolve the etiological diagnosis in many cases (van den Hoogen et al., 2001; van der Hoek et al., 2004). However, the proportion of LRTI without an etiological agent associated remains not contemptible. In 2005, human bocavirus (HBoV) was added to the ever expanding list of viruses associated to LRTI in children (Allander et al., 2005). Shortly after, a worldwide distribution of the virus was evidenced (Arnold et al., 2006; Bastien et al., 2006; Chung et al., 2006; Foulongne et al., 2006; Kaplan et al., 2006; Kesebir et al.,

* Corresponding author at: Virology Service, National Center of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. de Pozuelo Km. 2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 8223706; fax: +34 91 5097966.

E-mail address: pacopozo@isci.es (F. Pozo).

2006; Kleines et al., 2007; Lu et al., 2006; Ma et al., 2006; Sloots et al., 2006; Smuts and Hardie, 2006; Weissbrich et al., 2006).

To estimate the incidence of HBoV in children in Spain and to further define some of the epidemiological aspects and the main clinical manifestations associated with HBoV infection, we tested a total of 917 nasopharyngeal aspirate (NPA) specimens drawn from sick infants and children diagnosed of LRTI based on clinical evidence from September 2004 to August 2006. A new sensitive nested-PCR method for detection of HBoV is also described.

2. Material and methods

2.1. Clinical specimens

A total of 917 NPA specimens from 730 children under age of 14 diagnosed of acute LRTI based on clinical evidence were collected through two consecutive respiratory seasons (September-04 to August-06), irrespective of the requirement of hospitalisation and the presence of fever, at the pediatric unit of the Severo Ochoa hospital in Leganés (Madrid). Urine and stool samples were also taken from six patients during their stay in hospital in order to investigate additional routes of HBoV excretion. Specimens were aliquoted in duplicates at 200 μ l, one of them immediately processed and the remaining stored at -80°C . Specimens were screened for the presence of HBoV and other 15 respiratory viruses.

2.2. Clinical assessment

During the hospital stay pediatricians filled out a questionnaire covering sex, age (months) at admission, need for oxygen therapy measured as transcutaneous oxygen saturation, axillary temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$, length of hospital stay and clinical diagnosis.

2.3. Nucleic acids extraction

Nucleic acids were automatically extracted from 200 μ l aliquot of NPA specimens using the BioRobot M48 workstation and the MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen, Hilden, Germany). To check for the efficiency of acid nucleic extraction and for the presence of amplification inhibitors, an internal control was cloned and added to the lysis buffer.

2.4. Fifteen different respiratory virus detection by PCR methods

NPA specimens were tested for influenza virus A, B and C, RSV A and B and adenoviruses by using a multiplex RT-nested PCR (Coiras et al., 2003), and also for parainfluenza viruses 1–4, human coronaviruses 229E and OC43, enteroviruses and rhinoviruses by using a second multiplex RT-nested PCR (Coiras et al., 2004). hMPV was investigated

in all samples using a RT-nested PCR designed in the matrix gene (Lopez-Huertas et al., 2005).

2.5. HBoV detection by nested-PCR method

For sensitive and specific HBoV detection a nested PCR assay was developed. Primers were designed in highly conserved regions of the (NP-1) and VP1/VP2 genes based on a multiple alignment constructed with all genome sequences of bocaviruses available at the GenBank database. A whole of 5 μ l of total nucleic acid extracted were added to 45 μ l of reaction mixture containing 60 mM Tris-HCl (pH 8.5), 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 200 μ M of each dNTP, 2.5 units of Taq polymerase (Amplitaq, Perkin-Elmer Cetus) and 10 pmol of primers HBOV1f (5'-CACAGGAGCMGGAGYCGCAG) and HBOV1r (5'-CCAAGATATYTRTATCCAGG) for HBoV amplification and 10 pmol of primers RTS (5'-GCTTGGGCGTGTCTCAAATCT) and RTA (5'-GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT) for the internal control amplification. Amplifications were carried out in a Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research). Temperature and time profiles were 94°C for 2 min, 40 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, and 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 5 min. After the first amplification round, 1 μ l of the reaction product was added to 49 μ l of the nested reaction mixture containing the same reagents used for the first reaction mixture with exception of primers, HBOV2f (5'-GTGGTGTGGGTTCTACTGGC) and HBOV2r (5'-CTACGGTACACATCATCCCAG) for specific HBoV amplification, and NS3 (5'-CGTAATGGCTGGCCTGT) and NA2 (5'-GTAATGCTCTGCCAGTGT) for the internal control amplification. Cycling conditions were the same that those used for the first round, but only 30 cycles were necessary. A total of 10 μ l of each second round amplification product was subjected to electrophoresis on a 2% agarose in $0.5\times$ TBE gel stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and visualized under UV light. The specific band for HBoV corresponded to 243 bp and the internal control to 350 bp (Fig. 1). Usual precautions were implemented to avoid false positive results by carryover contamination. Positive results were confirmed by testing a new aliquot of sample.

Sensitivity of the HBoV nested-PCR method was estimated by testing serial dilutions of a plasmid DNA containing the first round amplified product (609 bp). This product was cloned into the pCR4-TOPO plasmid using the TOPO-TA Cloning Kit with One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Plasmids were extracted and purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). The copy number of the HBoV genome equivalents was estimated spectrophotometrically at OD_{260} .

To verify specificity, the amplified products with the expected size (243 bp) obtained after the second round of PCR were directly sequenced in both directions. PCR products were purified by using the QIAquick PCR Purification

Kit (Qiagen) and sequenced according to the manufacturer's protocol with the primers HBOV2f and HBOV2r by using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

3. Results

3.1. Sensitivity and specificity of the HBoV detection nested-PCR method

The sensitivity of the nested-PCR method for HBoV DNA detection was estimated in 10 genomic equivalents by testing serial 10-fold dilutions of the specific plasmid (Fig. 1). Specific HBoV DNA was demonstrated by sequencing all the amplification products with the expected size. Specificity of the nested-PCR assay was also assessed by testing 10 human parvovirus B19 positive serum samples.

3.2. Detection of HBoV and other 15 viruses in respiratory specimens

A positive result for HBoV was rendered in 123 out of 917 NPA specimens (13.4%) taken from 115 out of 730 patients studied (15.7%). Of these children, 49 were found to be infected only with HBoV. As shown in Table 1, recurrent wheezing or bronchiolitis were the clinical diagnosis more frequently observed. Remarkably, three distinct patients presented two independent HBoV-positive NPA samples submitted apart 28, 35, and 150 days, respectively.

The monthly distribution of HBoV infections in both seasons studied is shown in Fig. 2. HBoV was detected through the entire season with November and December as the peak months. No HBoV-positive specimens were obtained during July and August.

In addition to HBoV, all samples were examined for the presence of other 15 different respiratory viruses. Out of the 917 NPA specimens studied, at least one respiratory virus was detected in 558 samples (61%): RSV-A and RSV-B 181

Table 1

Characteristics of 49 children infected with HBoV as a sole respiratory virus

Characteristic	Value
Demographic data	
Age (mo), median (range)	22 (4–52)
Sex, male:female	29:20
Clinical characteristic	
Hospitalization	43 (88%)
Duration, median days \pm S.D.	4.3 \pm 2.8
Hypoxia (Sat. O ₂ \leq 93%), $n = 43^a$	25 (58%)
Clinical diagnosis	
Recurrent wheezing	22 (45%)
Bronchiolitis	12 (24%)
Pneumonia	7 (14%)
Fever syndrome	4 (8%)
Upper respiratory infection	4 (8%)

^a Hypoxia was only determined in hospitalized children.

(32%), adenoviruses 155 (28%), rhinoviruses 136 (24%) and HBoV that ranked fourth with 123 (22%) positive samples. Other different viruses detected were, in descending order of frequency, influenza A virus (33, 6%), hMPV (35, 6%), PIV-3 (28, 5%), enteroviruses (16, 3%), PIV-1 (14, 3%), PIV-4 (13, 2%), PIV-2 (9, 2%), influenza B virus (6, 1%) and coronavirus 229E (5, 1%).

Co-infections between HBoV and other respiratory viruses were detected in 74 out of 123 HBoV-positive specimens (60%). Dual detection was mainly observed with adenoviruses in 20 samples (27%), with RSV in 17 (23%) and rhinoviruses in 12 (16%). Three or more viruses were detected in 18 cases (24%).

3.3. Detection of HBoV in urine and stool specimens

HBoV DNA was additionally detected in urine and stool samples taken from two long-hospitalized (>5 days) children which had previously presented HBoV positive result in respiratory samples. No digestive problems, diarrhea or abdominal pain were observed in these patients.

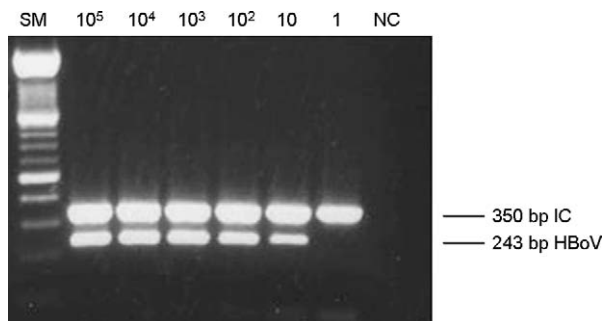


Fig. 1. Ethidium bromide stained agarose gel showing the specific 243 bp HBoV amplification product and the 350 bp band size corresponding to the internal control (IC). Sensitivity limit was estimated in 10 genomic equivalents by testing serial 10-fold dilutions of the specific plasmid. SM: size markers (100 bp). NC: negative control (H₂O).

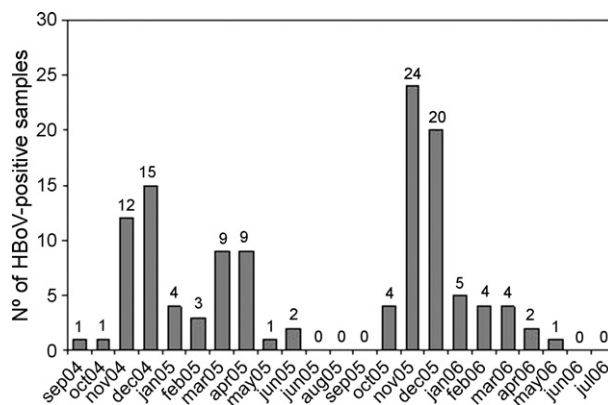


Fig. 2. Monthly distribution of HBoV-positive specimens from September 2004 to July 2006.

3.4. Single-nucleotide polymorphisms in HBoV amplification products

A total of 52 selected sequences of HBoV amplified products were further analysed. Compared with the reference isolate ST1 (GenBank DQ000495), an identical sequence was obtained in 38 isolates. A second group comprised seven sequences contained a G → A change at nucleotide 2744, identical to that observed in ST2 isolate (DQ000496). A third group of six sequences were identical to the Chinese isolate CZ745 (DQ494204) showed an A → G change at nucleotide 2786. Finally, a single-nucleotide polymorphism was observed in a single Spanish isolate, showing a G → A change at nucleotide 2804. None of these three nucleotide changes resulted in changes in the predicted amino acid sequence. Four of the sequences obtained were submitted to the GenBank database under the accession numbers EF117275–EF117278.

4. Discussion

In addition to well-established pathogens, novel viruses associated to respiratory infections have been identified in recent years, including hMPV ([van den Hoogen et al., 2001](#)) and three different coronaviruses ([Peiris et al., 2003](#); [van der Hoek et al., 2004](#); [Woo et al., 2005](#)). All of them are members of well recognized families of viruses involved in respiratory infections, such as *Paramyxoviridae* and *Coronaviridae*. For the first time, a member of the family *Parvoviridae*, HBoV, included in the genus *Bocavirus*, has also been detected in patients suffering respiratory illness ([Allander et al., 2005](#)).

In this study, the overall incidence of HBoV and other 15 different respiratory viruses among previously healthy children with acute LRTI was evaluated by using different nucleic acid amplification assays. Out of the 917 NPA specimens studied, a total of 123 tested positive for HBoV, accounting for 13.4%. This high incidence of HBoV infection observed in our study population, which consisted mainly in hospitalized patients, are in accordance with rates previously published ranging from 10.3% to 19% ([Allander et al., 2007](#); [Choi et al., 2006](#); [Kaplan et al., 2006](#); [Kleines et al., 2007](#); [Smuts and Hardie, 2006](#); [Weissbrich et al., 2006](#)). Nevertheless, rates appreciably lower ranging between 3.1% and 8% have also been published by other authors ([Allander et al., 2005](#); [Arnold et al., 2006](#); [Chung et al., 2006](#); [Foulongne et al., 2006](#); [Kesebir et al., 2006](#); [Lu et al., 2006](#); [Ma et al., 2006](#); [Sloots et al., 2006](#)). Rather than geographic differences in HBoV circulation, this discrepancy may be explained by differences observed in the patients studied. Several studies included exclusively hospitalized children while others enrolled either hospitalized and outpatient children. In the same way, several studies are focused on LRTI patients and others are based on patients with less severe lung disease, or infants and young children versus adults patients. In addition, differences observed in the incidence of HBoV infection

could also be due to the variety of respiratory samples taken from patients, or alternatively to differences inherent in sensitivity of PCR assays employed.

The sensitivity of the nested-PCR assay we have developed is high enough to detect at least 10 copies of HBoV genome equivalents. Comparable sensitivity has been reported using real-time PCR protocols ([Allander et al., 2007](#); [Kleines et al., 2007](#); [Lu et al., 2006](#)). Allander et al. detected HBoV in 49 NPA specimens out of 259 (19%) children hospitalized for acute expiratory wheezing. This percentage represents the highest incidence of HBoV infection reported to date. Interestingly, Kleines et al. quantified HBoV in samples and revealed that low viral loads dominated, irrespective of severity of clinical symptoms or patient's age. This finding highlights the importance of using very sensitive PCR assays to warrant the detection of HBoV. The good sensitivity of the nested-PCR assay used in this study permitted, as well as in real-time PCR protocols, high rates of HBoV detection.

Our data reveals the presence of HBoV in stool and, for the first time, in urine specimens of two patients with respiratory symptoms. No digestive problems, diarrhea nor abdominal pain were observed in these patients. Nevertheless, diarrhea is a relatively common symptom presented in patients with HBoV infection ([Arnold et al., 2006](#); [Kesebir et al., 2006](#)). The presence of HBoV in stool and urine samples may merely reflect the excretion of the virus by the digestive and urinary tracts, but also could be considered suggestive of other manifestations of HBoV-associated disease, not limited to the respiratory tract. As a support of this hypothesis, detection of HBoV in serum specimens taken from children with an episode of acute wheezing has recently been published ([Allander et al., 2007](#)). Systemic infections are a well-known fact for most parvovirus infections, including both bovine parvovirus ([Storz et al., 1978](#)) and minute virus of canines ([Carmichael et al., 1994](#)), the two other members of the genus *Bocavirus*.

The monthly distribution of HBoV-positive specimens suggests an epidemiological profile similar to adenoviruses and rhinoviruses, with cases reported throughout the entire epidemic season, in contrast to RSV, hMPV and influenza A and B viruses, with most of the cases reported in the context of outbreaks during the winter cold months. In our Mediterranean country, HBoV infections were identified in September to June over a continuous 23-month period studied ([Fig. 2](#)). November and December were by far the peak months, in contrast to those reported in Korean children occurring from May to July ([Choi et al., 2006](#)).

It is pointed up the common occurrence of multiple detection of respiratory viral agents, which suggest the high incidence of co-infections in respiratory infection. In this study, HBoV was co-detected with one or more respiratory viruses in 74 out of 123 HBoV-positive specimens (60%). This high co-infection rate found in our patients is agreed with other series published ([Allander et al., 2005](#); [Choi et al., 2006](#); [Sloots et al., 2006](#)). High co-infections rates is not in opposition to a pathogenic role of HBoV in respiratory dis-

eases. In fact, the only study to date including asymptomatic control infants reported a zero incidence of HBoV infection in this group, then providing a statistical association of the virus with disease (Kesebir et al., 2006).

Remarkably, three distinct patients presented two different HBoV-positive NPA specimens submitted apart 28, 35, and 150 days, respectively. This could suggest a long-time persistence of HBoV after initial acute infection, a possibility strongly supported by the evidence of HBoV DNA presence in convalescent-phase serum specimens collected from children with acute wheezing 2–3 weeks after discharge from the hospital (Allander et al., 2007). Nevertheless, it might be a reflect that infants and children, as well as occurs with other respiratory viruses, could be re-infected with HBoV, twice at least in the same season. Unfortunately, urine and stool specimens could not been collected from these three patients.

Taken together, these results provide further and convincing evidence that HBoV is involved in LRTI. Additional studies will clarify the clinical and epidemiological significance of the presence of HBoV in clinical samples other than respiratory origin, such as urine and stool specimens.

Acknowledgments

The authors acknowledge technical assistance from Manuela López-Valero and Nieves Cruz in the Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, ISCIII. This work was supported by grants from the ISCIII (MPY 1251/00 and MPY 1018/04).

References

- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:12891–6.
- Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44:904–10.
- Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis* 2006;43:283–8.
- Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12:848–50.
- Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest* 1994;6:165–74.
- Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clin Infect Dis* 2006;43:585–92.
- Chung JY, Han TH, Kim CK, Kim SW. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1254–6.
- Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004;72:484–95.
- Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol* 2003;69:132–44.
- Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1251–3.
- Kaplan NM, Dove W, Abu-Zeid AF, Shamooh HE, Abd-Eldayem SA, Hart CA. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1418–20.
- Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194:1276–82.
- Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Hausler M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microbiol* 2007;45:1032–4.
- Lopez-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, Garcia ML, Coiras MT, Perez-Brena P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005;129:1–7.
- Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, et al. PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol* 2006;44:3231–5.
- Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, et al. Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2006;44:1132–4.
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1319–25.
- Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol* 2006;35:99–102.
- Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1457–8.
- Storz J, Leary JJ, Carlson JH, Bates RC. Parvoviruses associated with diarrhea in calves. *J Am Vet Med Assoc* 1978;173:624–7.
- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719–24.
- van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10:368–73.
- Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis* 2006;6:109.
- Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79:884–95.

Resumen de los artículos

High incidence of human bocavirus infection in children in Spain.

J Clin Virol 2007; 40(3):224-8

Propósito

En septiembre del año 2.005 la comunidad científica tuvo noticia del descubrimiento de un nuevo virus respiratorio, denominado bocavirus humano, en muestras procedentes de niños suecos con infecciones respiratorias de vías bajas. Los estudios filogenéticos permitieron clasificarle dentro de la familia *Parvoviridae* y, a juzgar por los resultados de este primer trabajo y otros publicados en los meses siguientes, parecía tratarse de un virus muy prevalente en las infecciones respiratorias de los niños.

De nuevo teníamos la oportunidad de reducir el porcentaje de las infecciones respiratorias graves en las que no se identifica ningún agente causal. Para ello nos propusimos realizar este estudio, encaminado a validar la PCR diseñada por nuestro grupo para la detección de HBoV en el aspirado nasofaríngeo y a investigar si este nuevo virus estaba circulando en España en los niños hospitalizados por infección respiratoria. Hasta el momento de comenzar el estudio, no se había publicado ningún caso de bocavirus humano en España.

Pacientes y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, en el que se incluyeron todos los niños menores de 14 años hospitalizados por alguna infección respiratoria, y cuyos padres consintieron en participar. El período de estudio comprendió dos temporadas completas, desde septiembre de 2.004 hasta agosto de 2.006.

Se empleó un cuestionario con variables clínicas y epidemiológicas, que de forma rutinaria se incorpora a la Historia Clínica de cada paciente,

de forma que los datos se fueron recogiendo a medida que iban ocurriendo (Figura 9). Se recogieron aspirados nasofaríngeos en todos los casos, que fueron remitidos al Laboratorio de Gripe y Virus Respiratorios, donde se realizó una RT-PCR múltiple para VRS-A y B, influenza A, B y C y adenovirus y una segunda RT-PCR múltiple para parainfluenza 1, 2, 3 y 4, rinovirus y coronavirus 229E y OC43. La determinación de hMPV y de HBoV se realizó mediante dos ensayos de nested-PCR diseñados expresamente al efecto.

Análisis estadístico

Todas las variables fueron introducidas en una base de datos y analizadas con el programa SPSS 11.0. Se evaluaron las diferencias entre los grupos mediante el test de Chi cuadrado o test exacto de Fisher, en el caso de proporciones, y test de la T de Student en el caso de variables cuantitativas.

Resultados

De los 730 pacientes incluidos, se detectó HBoV en 123 muestras procedentes de 115 niños, lo que supone una frecuencia de 15,7% del total. Se detectó coinfección con otro virus respiratorio en 123 muestras (60%). Además se detectó DNA de HBoV en orina y heces de dos niños con ingresos prolongados, en los que se había detectado previamente HBoV en muestras respiratorias. Ninguno de estos dos pacientes presentaba síntomas digestivos.

HBoV circuló durante todo el año, con la excepción de julio y agosto, mostrando un pico de máxima incidencia en noviembre y diciembre. Los diagnósticos clínicos más frecuentes fueron episodio recurrente de sibilancias/asma, bronquiolitis y neumonía.

Conclusión

En este estudio se ha validado la nested-PCR diseñada por nuestro grupo para la detección de HBoV en secreciones respiratorias,

demonstrándose la circulación de HBoV en España. Según nuestros resultados, HBoV es uno de los virus más frecuentes en las infecciones respiratorias de los niños hospitalizados. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en este grupo de edad son las exacerbaciones asmáticas, las bronquiolitis y las neumonías.

Mención especial merece la elevada frecuencia con la que HBoV coinfecta con otros virus respiratorios.

HUMAN BOCAVIRUS DETECTION IN NASOPHARYNGEAL ASPIRATES OF CHILDREN WITHOUT CLINICAL SYMPTOMS OF RESPIRATORY INFECTION.

Authors

García-García ML (MD)¹, Calvo C (PhD)¹, Pozo F (PhD)², Pérez-Breña P² (PhD), Quevedo S (MD)¹, Bracamonte T (MD)¹, Casas I (PhD)².

¹ Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital. Madrid. Spain

² Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, National Center of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Spain.

Partially supported by grants: 98/0310 and PI06/0532 of Spain's "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (Health Research Fund).

Corresponding Author:

M^a Luz García-García. Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital.

Avda Orellana s/n. Leganés. Madrid 28911. Spain.

Telephone number: 0034 91 481 84 60

Fax number: 0034 91 694 07 17

e-mail: marialuzgarcia@terra.es

Key words: human bocavirus; rhinovirus; respiratory infections; children.

Abbreviated title: Human bocavirus detection in asymptomatic children

Running head title: Human bocavirus in healthy children

Recently, a new respiratory virus named human bocavirus (HBoV) has been identified by large-scale molecular virus screening from pooled human respiratory tract samples of Swedish infants and children, with lower respiratory tract disease¹. The original series was composed of 17 hospitalized children, with a detection rate of 3.1%. Soon after, HBoV was also reported in respiratory samples from hospitalized children around the world, with detection rates as high as 19%². These studies showed that HBoV is one of the most frequent viruses in hospitalized children with respiratory infection. However, little is known about the presence of HBoV in asymptomatic children. Therefore, data on HBoV prevalence in asymptomatic children are needed to draw any conclusions about causation. The main objective of our study was to determine the frequency of HBoV detection in asymptomatic children and to compare it with that of hospitalized children due to respiratory infection.

CHILDREN AND METHODS

Children

This study is part of a larger, ongoing, prospective investigation on respiratory tract infections in children, funded by FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias – Spanish Health Research Fund) Grants N°: 98/0310, PI06/0532. Two groups of children were screened for HBoV. The first group was admitted to the secondary public hospital Severo Ochoa (Leganés, Madrid) with respiratory tract infections, between September 2004 and December 2006. The second group of children was comprised of asymptomatic control subjects admitted for elective surgery or for food challenges, throughout a whole year. The parents completed a questionnaire regarding respiratory symptoms of the child during the preceding 10 days (cough, fever > 38°C, sore throat, rhinitis, acute otitis media, pneumonia or wheezy bronchitis). The parents of asymptomatic children were also contacted by phone ten days after discharge and were asked about the presence of the same symptoms during 10 days following discharge.

The study protocol was accepted by the Ethical Committee of the Severo Ochoa Hospital. A written informed consent was obtained from each patient's guardian.

1024 children were included in the study.

Samples

Nasopharyngeal aspirate samples (NPAs) were collected and transported, after the addition of an equal volume of viral transport medium, to the Respiratory Virus Laboratory in the National Microbiology Center (ISCIII, Madrid, Spain), being processed within 24 hours of collection. All NPAs were tested for influenza virus A, B and C, RSV A and B and adenoviruses, parainfluenza viruses 1 to 4, human coronaviruses 229E and OC43, enteroviruses and rhinoviruses by using two multiplex RT-nested PCR assays, as previously described³. hMPV was investigated in all samples using a RT-nested PCR designed in the matrix gene⁴. A nested PCR assay, recently described by our group, was used for HBoV detection⁵. The virologists were blinded with respect to the clinical status of the children.

RESULTS

Hospitalized patients

The study population consisted of 908 hospitalized children < 14 years of age with acute respiratory infection. At least one respiratory virus was detected in 587 (64.6%) children. Of them, 400 were single viral infections: 261 (65.2%) were RSV, 141 (35.2%) were rhinovirus, and 153 (38.2%, CI 95%: 18%, 15.6%) were HBoV. Other viruses less frequently detected were adenoviruses (18.4%), parainfluenza viruses (5.9%), hMPV (3%), influenza viruses (3%), and enteroviruses (2.2%). Dual or multiple infections were found in 187 cases (31.8% of positive samples). Infections with HBoV were found year-round, although most occurred in the winter and spring

months. Most patients were diagnosed of lower respiratory tract infection as described previously in the literature.

Asymptomatic children

120 asymptomatic children were invited to participate in the study. 4 parents refused their children to be included and 116 were finally recruited. 40 (34.4%) of 116 children tested positive for at least one respiratory virus. Of them, 16 reported a respiratory infection within the 10 previous days to the specimen collection. The remaining 24 (20.6%) children had been totally free of respiratory symptoms. Phone contact after discharge was not possible with 3 of these 24 children.

Rhinovirus and adenovirus were the most frequently detected viruses (11 and 5 cases respectively). HBoV was the only virus detected in 4 children. One of them had been diagnosed of pneumonia 3 weeks before. Another child developed an upper respiratory infection 3 days after discharge, whereas in the other 2 children could not be demonstrated a symptomatic infection. Dual detections were found in 5 children, including 4 cases with HBoV. All of them referred to be asymptomatic previous to the sample collection and also during the follow-up. Therefore, the frequency of HBoV detection in asymptomatic children was 5% (6/116).

More detailed information about viral detection is shown in Table 1.

Positive viral detection of HBoV was significantly more frequent in ill patients than in healthy children, $p < 0.001$, OR:3.7 (CI95%:5.36,2.04).

DISCUSSION

It has been shown in this study, for the first time, that HBoV can be detected in the nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. However, the HBoV detection rate in healthy children was significantly lower (5%) than the observed in hospitalized children with respiratory infection (17%), $p < 0.001$. One HBoV-positive children had been diagnosed of pneumonia 3 weeks before the respiratory sample was

collected. Very little is known about the duration of respiratory virus colonization in the nasopharynx, nevertheless, based on the epidemiologic knowledge of other viruses, we considered that this HBoV detection could be related with the former infection.

Other respiratory viruses, as rhinovirus, have been described up to 20% in asymptomatic children⁶. In our series 20% of healthy children tested positive for at least one respiratory virus, being rhinovirus the most frequently detected (12%). Other viruses, as adenovirus, whose pathogenic role is clearly established, was diagnosed in 6.7% of healthy children.

Till now, only Kesebir et al⁷ had investigated the presence of HBoV in asymptomatic children. In their study none of the 96 asymptomatic children screened, tested positive for HBoV. On the basis of the high frequency of HBoV detection in samples obtained from individuals hospitalized with acute respiratory illness and the low frequency in healthy children, it could be argued that HBoV could be an etiologic agent of respiratory tract disease. Nevertheless, proof of causality is difficult and rarely emerges from one study, but instead depends on an accumulation of evidence⁸. Further studies, where the duration of HBoV colonization in the nasopharynx can be evaluated are still needed. As it has been described with respiratory syncytial virus⁹, the quantification of HBoV DNA load will be of help to establish the etiologic role of the virus.

Table 1: Positive viral detection in healthy children (n = 40).

Nº (% total)	Virus	Previous infection	Posterior infection
11(9.5)	RV	NO	NO
5 (4.3)	AD	NO	NO
2 (1.7)	HBoV	NO	NO
1 (0.8)	RSV	NO	NO
2 (1.7)	HBoV + RV	NO	NO
1 (0.8)	HBoV + AD	NO	NO
1 (0.8)	AD + RV	NO	NO
1 (0.8)	AD + hMPV	NO	NO
4	RV	NO	Yes (URTI)
1	RV	NO	Yes (Asthma)
3	AD	NO	Yes (URTI)
1	AD	Yes (IRA)	Yes (URTI)
1	HBoV	Yes (Pneumonia)	NO
1	HBoV	NO	Yes (URTI)
1	RSV	Yes (IRA)	Yes (Bronchiolitis)
1	RSV	NO	Yes (URTI)
1	PIV + RV	NO	Yes (Asthma)
1	HBoV + RV	NO	Yes (URTI)
1	AD + RV	NO	Yes (URTI)

RV: rhinovirus, AD: adnovirus, HBoV: human bocavirus, RSV: respiratory syncytial virus, hMPV: human metapneumovirus, PIV: parainfluenza virus, URTI: upper acute respiratory infection.

REFERENCES

- ¹ Allander T, Tammi M, Ericsson A, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:12891-6.
- ² Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters H, Lehtinen P, Österback R et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44:904-10.
- ³ Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004 ;72:484-95.
- ⁴ López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, García-García ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005;129:1-7.
- ⁵ Pozo F, García-García ML, Calvo C, Cuesta I, Pérez-Breña P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* (In press).
- ⁶ Nokso-Koivisto J, Kinnari TJ, Lindahl P, Hovi T, Pitkäranta A. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol* 2002;66:417-20
- ⁷ Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro E, Ferguson D, Landry M, Kahn S. Human Bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194:1276-82

⁸ McIntosh K, Human bocavirus: developing evidence for pathogenicity. J Infect Dis.2006;194:1197-9.

⁹ Campanini G, Percivalle E, Baldanti F, Rovida F, Bertaina A, Marchi A, et al. Human respiratory syncytial virus (hRSV) RNA quantification in nasopharyngeal secretions identifies the hRSV etiologic role in acute respiratory tract infections of hospitalized infants. J Clin Virol 2007;39:119-24.

Human Bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection

Pediatric Infectious disease Journal 2008;27(4):358-60.

Propósito

Dada la dificultad para demostrar, mediante estudios experimentales, el papel causal de los nuevos virus en las infecciones respiratorias, se necesitan estudios que de forma indirecta aporten evidencias a favor o en contra del papel patogénico de estos virus. Una de las estrategias de investigación en este sentido, que además ha constituido el objetivo de este estudio, determinar si HBoV está presente en las muestras respiratorias de los niños sanos.

Pacientes y métodos

Se incluyeron niños sanos que acudían al hospital para pruebas de provocación alimentaria, a lo largo de un año y cuyos padres estuvieron de acuerdo en participar. Los padres de estos niños fueron interrogados acerca de la presencia de síntomas respiratorios y/o fiebre en los 10 días previos a la recogida de la muestra y fueron contactados telefónicamente 10 días después, para preguntarles de nuevo por la aparición de algún síntoma respiratorio y/o fiebre desde la inclusión en el estudio (Figura 10).

Se obtuvo una muestra respiratoria mediante aspirado nasofaríngeo en todos los casos, que fue transportada, como se ha descrito en los estudios previos, al Laboratorio de Gripe y Virus Respiratorios del Instituto Carlos III. Allí fue procesada, determinándose mediante RT-PCR la presencia de VRS A y B, influenza A, B y C, adenovirus, parainfluenza 1, 2, 3 y 4, rinovirus, coronavirus 229E y OC43, hMPV y HBoV. Los virólogos desconocían, en el momento de procesar las muestras, si el niño presentaba o no síntomas respiratorios en el momento de la recogida de las mismas.

Resultados

Se incluyeron 116 niños asintomáticos. En 40 (34,4%) se detectó al menos un virus respiratorio. De ellos, 16 habían presentado alguna infección respiratoria en los 10 días previos, mientras que los 24 restantes habían estado totalmente asintomáticos. Los virus más frecuentes fueron rinovirus y adenovirus (11 y 5 casos respectivamente). Se detectó HBoV como único agente en 4 niños. Uno de ellos había presentado una neumonía 3 semanas antes y otro desarrolló una infección respiratoria de vías altas en la semana posterior. Los otros dos niños habían estado asintomáticos. Además se encontró coinfección de HBoV con otro virus en otros 4 casos. Todos ellos habían estado asintomáticos antes y después de la obtención de la muestra. Por tanto, la detección de HBoV en niños sanos fue de 5%, significativamente inferior al 16% de detección observado por nuestro grupo en un estudio previo en niños con síntomas respiratorios ($p < 0,001$).

Se detectó hMPV en el 0,6% de los niños sanos, frente al 3% de los niños sintomáticos.

Conclusión

En base a la frecuente detección de HBoV en niños hospitalizados con infección respiratoria, en comparación con los niños sanos, es posible que HBoV juegue un papel etiológico en las infecciones respiratorias de los niños. Se necesitan, no obstante, nuevos estudios que investiguen la duración de la excreción de HBoV tras un episodio agudo de infección y que permitan cuantificar la carga viral de este virus de forma secuencial a lo largo del tiempo.

Figura 10. Cuestionario clínico controles sanos

IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE		
Fecha de Ingreso:	Fecha de alta:	Género:
¿Ha presentado su hijo en los últimos 10 días alguno de los siguientes?:		
Fiebre > 38° C: SI / No	Fiebre entre 37 y 38° C: SI / NO	
Temperatura máxima:		
Duración de la fiebre (desde el comienzo):		
Rinorrea (mocos): SI / NO	Tos: SI/ NO	
Sibilancias: SI/ NO	Tratamiento antibiótico: SI / NO	
Aerosoles (ventolin, salbutamol...): SI / NO		
Radiografía de tórax:		
- Normal	Anormal	
Diagnóstico de su pediatra:		
***** DATOS SEGUIMIENTO 10 DÍAS*****		
¿Ha presentado su hijo en los últimos 10 días alguno de los siguientes?:		
Fiebre > 38° C: SI / No	Fiebre entre 37 y 38° C: SI / NO	
Temperatura máxima:		
Duración de la fiebre(desde el comienzo):		
Rinorrea (mocos): SI / NO	Tos: SI/ NO	
Sibilancias: SI/ NO	Tratamiento antibiótico: SI / NO	
Aerosoles (ventolin, salbutamol...): SI / NO		
Diagnóstico de su pediatra:		

**DETECTION OF HUMAN BOCAVIRUS IN ILL AND HEALTHY SPANISH CHILDREN.
A 2-YEAR STUDY**

Authors

García-García ML (MD)¹, Calvo C (PhD)¹, Pozo F (PhD)², Pérez-Breña P² (PhD),
Vázquez MC (MD)¹, Casas I (PhD)²

¹ Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital. Madrid. Spain

² Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, National Center of Microbiology,
Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Spain.

Corresponding Author:

M^a Luz García-García. Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital.

Avda Orellana s/n. Leganés. Madrid 28911. Spain.

Telephone number: 0034 91 481 84 60

Fax number: 0034 91 694 07 17

e-mail: marialuzgarcia@terra.es

Word count: 2156

Key words: human bocavirus; human metapneumovirus; respiratory syncytial virus;
respiratory infections; children

Background. HBoV, a recently discovered parvovirus, is present in a substantial proportion of respiratory tract diseases of suspected infectious origin. The relative importance of HBoV in viral respiratory tract illnesses is still not well known.

Objective. This study looked for HBoV in pediatric patients and asymptomatic children, to determine the prevalence of HBoV compared with common respiratory viruses and to describe the clinical course associated with HBoV infections in children.

Methods. A prospective study was conducted on the clinical characteristics of children less than 14 years old admitted for respiratory infection between September 2004 and December 2006 at the Pediatrics Department of the Severo Ochoa Hospital in Madrid (Spain). The incidence of HBoV and other fifteen respiratory viruses was tested in nasopharyngeal aspirates of these patients and in asymptomatic children.

Results. At least one respiratory virus was detected in 587 (64.4%) of the 908 studied patients. HBoV was found in 153 (16.8%) samples and was the most common virus after RSV. Infections with HBoV were found year-round, although most occurred in the winter months. 50% of patients with HBoV infection were aged ≤ 14.3 months. The more common diagnoses were recurrent wheezing (51%) and bronchiolitis (30.5%). Fifty-five percent of patients required oxygen therapy and 70% presented high fever. Other manifestations of HBoV-associated disease outside the respiratory tract could be observed such as petechial skin rash, thrombopenia, and clinical sepsis. In 99 (65%) of the HBoV positive children, coinfections with other respiratory viruses were present. No significant differences were found between single and dual or multiple infections. HBoV was detected in 5% of asymptomatic children.

Conclusions: HBoV was the second most prevalent virus after RSV in children hospitalized for respiratory infection, and was associated with recurrent wheezing and bronchiolitis as well as extrapulmonary manifestations. Co-infections were frequent and clinically similar to single infections.

INTRODUCTION

Viral respiratory infections impose an enormous burden on the pediatric population and are responsible for considerable morbidity and mortality. However, knowledge of the etiology of these infections is limited. Fortunately, the introduction of PCR-based screening for well-established pathogenic viruses, has led to a better understanding of the etiology of severe respiratory infections. HMPV, described originally in The Netherlands¹ and afterwards in many countries including Spain^{2,3,4,5,6,7} seems to play a significant role in severe pediatric respiratory infections.

Recently, a new respiratory virus named human bocavirus (HBoV) has been detected from pooled human respiratory tract samples from Swedish children with lower respiratory disease⁸. Phylogenetic studies have shown that this virus belongs to the *Parvoviridae* family. The original series was composed of 17 hospitalized children (3.1%). Soon after this original study, HBoV was also reported in respiratory samples from many countries around the world^{9,10,11,12,13,14,15,16,17}. In most of them, HBoV was frequently found in children with respiratory infections, showing a high rate of coinfection with other viral agents. However, as most studies have been retrospective, there are still many gaps in the knowledge of this virus. Our main objective was to estimate the prevalence of HBoV in Spanish children hospitalized due to respiratory infection and to describe its clinical and epidemiological characteristics. The second objective was to estimate the frequency of HBoV in asymptomatic children.

PATIENTS AND METHODS

This is a substudy of an ongoing, prospective from January to December 2006 and retrospective from September 2004 to December 2005, investigation on respiratory tract infections in children, funded by FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias – Spanish Health Research Fund) Grants N°: 98/0310, PI06/0532 and approved by The

Medical Ethics Committee. Two groups of children were screened for HBoV. The first one was admitted to the Severo Ochoa Hospital (Madrid) with respiratory infection, between September 2004 and December 2006. The second group was comprised of asymptomatic children admitted for elective surgery or for food challenges, throughout a whole year. NPAs, obtained after the parent or guardian of the child provided written informed consent, were transported to the Influenza and Respiratory Virus Laboratory in the National Microbiology Center (ISCIII, Madrid, Spain), being processed within 24 hours of collection.

Viral detection

Fifteen different respiratory virus detection PCR methods

All NPAs were tested for RSV A and B, influenza virus A, B, C and adenoviruses using a multiplex RT-nested PCR¹⁸ and also for parainfluenza viruses 1 to 4, human coronaviruses 229E and OC43, enteroviruses, and rhinoviruses using a second multiplex RT-nested PCR, as previously described¹⁹. HMPV was investigated in all samples using a RT-nested PCR designed in a matrix gene²⁰. The new coronavirus NL63 and HKU1 were not included in this study.

HBoV detection nested-PCR method

A nested PCR assay, recently described by our group²¹, was developed for sensitive and specific HBoV detection.

Clinical assessment and statistical analysis

Hospitalized patients. During the hospital stay, a questionnaire was filled out with clinical variables. The same criteria employed previously by our group were used to diagnose: *upper respiratory tract infection bronchiolitis, recurrent wheezing and pneumonia*⁷.

Asymptomatic children. Parents were asked about the presence of any respiratory symptoms in the 10 previous days. Children were included if they had been asymptomatic and a NPA was collected. Ten days after discharge, parents were reinterviewed by phone, asking them about the presence of any respiratory symptoms in their children.

Values were expressed as percentages for discrete variables or as mean and standard deviation for continuous variables. Clinical characteristics and laboratory variables were compared using the Student *t* test, the Mann-Whitney *U* test, the χ^2 test, and the Fisher's exact test. A two-sided value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. All analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Version 13.0.

RESULTS.

Hospitalized patients

Screening and patient demographic characteristics.

908 hospitalized children < 14 years of age with acute respiratory infection were included. At least one respiratory virus was detected in 587 children: 261 (28.7%) were RSV, 153 (16.8%; CI 95%: 18%, 15.6%) were HBoV and 141 (15.5%) were rhinovirus. The other viruses detected are shown in Fig. 1. Dual or multiple infections were found in 187 cases (31.8% of positive samples).

Seven patients had two or three positive HBoV specimens more than 1 month apart. Each of those specimens was clinically considered to be a separate episode of infection, resulting in 153 admissions in 144 children. Phylogenetic analysis of the HBoV positive NPA samples in our study population confirmed previous findings that HBoV genome is highly conserved, although it could be defined at least two clusters. In our study, co-circulation of both genetic clusters of HBoV described previously, Sweden ST1-like and Sweden ST2-like, was found. In each of the 7 patients with

several positive specimens the same virus Sweden ST1-like was identified except in one patient who sequences shown a ST2-like HBoV in both samples.

Infections with HBoV were found year-round, although most occurred in the winter months. (Fig.2). 50% of patients with HBoV infection were aged ≤ 14.3 months, and 75% were less than 21.4 months old.

Clinical findings associated with the presence of HBoV

Clinical characteristics for the 153 children with HBoV infection are shown in Table 1. Mean duration of hospital stay was 4.6 days with a range between 1 and 19 days. Two patients were admitted to the intensive care unit, and none of the children died. A total of 139 (91%) patients had clinical evidence of lower respiratory infection. Recurrent wheezing was the most frequent diagnosis, and bronchiolitis was the second one. Eighty-four patients (55%) with HBoV infection required administration of oxygen. Fever was common. Forty nine (32%) children received antibiotics during their hospital stay: 34 of them had infiltrate/atelectasis, 2 were suspected of having clinical sepsis, 7 had otitis media, 1 had a radiologic diagnosis of sinusitis, 1 had arthritis, 1 presented with high fever and venoocclusive crisis, and 1 presented with high fever and pleocytosis in the cerebrospinal fluid.

The patient with sickle cell anemia acquired nosocomial pneumonia during hospitalization, and HBoV was the sole infectious agent detected.

A 2.5 year-old girl with pneumonia and HBoV infection developed severe pleural effusion requiring pleural drainage. No bacteria were isolated from the blood or pleural fluid.

Although respiratory tract infection was the most common manifestation associated with HBoV infection, other systems seemed to be involved. Three HBoV-infected patients showed cutaneous symptoms. Two infants 14 and 12 months of age with single HBoV infection presented with fever without focus (minimal rhinorrhea), hypotension, petechial rash, and poor perfusion. Both of them were diagnosed with clinical sepsis, and one was admitted to the ICU. No other microorganism was

isolated. The third patient, a 14 month old girl admitted for thrombocytopenia (14.000 platelets), upper respiratory symptoms, and petechial skin rash, presented rhinovirus, RSV, and HBoV simultaneously in the NPA sample.

Five patients with lower respiratory infection were simultaneously diagnosed with acute diarrhoea, without any other enteritic symptoms, four patients with acute media otitis, one with acute mastoiditis, and two with conjunctivitis.

In 99 (65%) of the HBoV positive children, coinfections with other respiratory viruses were present. The viruses most frequently associated with coinfections were RSV (n=25), adenovirus (n= 24), and rhinovirus (n=14).

The clinical characteristics of 54 single HBoV infections were compared with coinfections. No significant differences were found between single and dual or multiple infections (Table 1).

Asymptomatic children

A total of 120 asymptomatic children were invited to participate in the study and 116 were finally recruited. Rhinovirus and adenovirus were the most frequently detected viruses (11 and 5 cases respectively). Dual infections were found in 5 children. In 4 children HBoV was the only virus detected in NPA samples. One of them was diagnosed with pneumonia 3 weeks before and HBoV detection could be related with this previous infection. Another child developed an upper respiratory infection 3 days after discharge and other two children remained asymptomatic. By other hand, HBoV was also co-detected with other respiratory viruses in other 4 asymptomatic children. All of them referred to be asymptomatic previously to the sample collection and also in the follow-up. No patients in the healthy group had enteritic symptoms. Therefore, the frequency of HBoV detection in asymptomatic children was 5% (6/116) that is significantly different from the 17% in the hospitalized population ($p < 0,001$).

DISCUSSION

We report here one of the largest pediatric series of HBoV infections described to date. According to these results, HBoV has circulated in Spain with a very high incidence, (17%), over a continuous 27-month period. HBoV was the second most frequent virus after RSV. This is one of the highest prevalence of HBoV described to date. In the original series described by Allander et al⁸ the detection rate was 3.1%. Soon after, new reports were published^{9,10, 11,12}, with frequencies from 5.7% to 1.5%. More recent reports have shown similar detection rates^{14,15}. Recently, another two series have been described. The first one, in Jordan, detected HBoV in 18.3% of children hospitalized with acute respiratory infection¹⁵, and the other in Finland, found an incidence of HBoV infection of 19% in hospitalized children with acute expiratory wheezing²².

With regard to its relative frequency, HBoV was the second most frequent virus in this series after RSV. A major strength of this study is the use of a panel of very sensitive PCR assays^{18,19,20} for a full range of respiratory viruses over two full calendar years. In the Australian series⁹ HBoV was also the second most frequent virus, but PCR for rhinovirus was not performed, and previous studies have shown that rhinovirus is one of the most frequent agents in pediatric respiratory infections, after RSV^{23,24}.

HBoV shows the highest frequency of coinfection with other respiratory viruses; 56% in the Australian study⁹ and 72% in the Jordanian study¹⁵. In our study, the prevalence of coinfections was also very high, 65%, occurring most often with RSV, adenovirus, and rhinovirus. Probably the coinfection rate might be even higher as we did not include coronaviruses NL63 and HKU1. In other studies, the frequency of coinfection, was considerably lower than the described by our group, probably due to the different study design: some authors investigated the presence of HBoV only in negative samples^{10, 14}.,others did not include detection of rhinovirus or hMPV¹⁶ and in

some cases immunofluorescence was employed, instead of the more sensitive PCR technique employed in our study and in the Jordanian series^{11,13, 25}.

The phylogenetic analysis of HBoV sequences from seven patients with two or three follow up samples, taken in the same or in different seasons, indicates that the same HBoV could be present at the time of diagnosis and exhibits a long time shedding which is a possible explanation of the high coinfection rates of viruses in respiratory NPA samples.

The age distribution of HBoV infections found in this study was similar to that found in previous reports^{8,9,10,11,12}. Most HBoV infections in hospitalized children occurred in the first two years of life.

The most common diagnosis of HBoV-infected children was asthma exacerbation followed by bronchiolitis. Most patients (71%) presented with high fever, and over half of them required oxygen-therapy and relatively long hospital stays. One patient with bronchiolitis required ICU admission. Infiltrate/atelectasis was also frequent (30%). In this study, two infants were identified with petechial skin rash and serious systemic involvement, and one was admitted to the ICU. In previous studies, some children with maculopapular erythematous rashes were reported^{26,27} but with a milder clinical picture.

No significant differences could be shown between single and dual infections. In most studies, no clinical differences were found among patients with respiratory infections, caused either by a single or by more viral agents, whether in hospitalized patients or in outpatients children^{28,29,30}.

This study seems to indicate an association between HBoV and lower respiratory tract infections on the basis of its frequent detection in samples from individuals hospitalized with acute respiratory illness (17%) and the low frequency of HBoV detection in 116 healthy children (5%) screened over one year. On the other hand, none of the asymptomatic children screened by Kesebir et al¹⁴ tested positive for HBoV. On the basis of these data, it could be argued that HBoV could be an etiologic

agent of respiratory tract disease, although more studies are needed to determine the shedding period of HBoV after an acute respiratory infection.

In conclusion, these data demonstrate that HBoV circulates in Spain. Furthermore, this study confirms the epidemic nature of HBoV infection and HBoV's significant role as a major pathogen in acute respiratory infections severe enough to require hospitalization, especially in children younger than 2 years of age. In this age group, HBoV is the second most frequently found respiratory virus. Given the high incidence and the important clinical impact of HBoV infections, the routine detection of HBoV should be incorporated into the diagnosis of severe respiratory infections in infants and young children.

This study has been partially supported by grants: 98/0310 and PI06/0532 of Spain's "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (Health Research Fund).

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non-exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article to be published in Archives of Disease in Childhood editions and any other BMJ PGL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence <http://adc.bmjjournals.com/ifora/licence.pdf>

Table 1. Clinical characteristics associated with hospitalized HBoV infections (single vs. dual infections)

Clinical feature	Single infection (N=54) N (%)	Coinfection (N=99) N (%)	p
Age (mean, months)	16 ± 10.6	20 ± 22	0.106
Male	32 (60.4%)	58 (59.2%)	0.887
Prematurity	8 (15%)	13 (13.7%)	0.742
Temperature > 37.9°C	38 (71.7%)	68 (70.1%)	0.837
Hypoxia (SatO ₂ <95%)	28 (52.8%)	55 (57.3%)	0.600
Abnormal chest radiograph	18 (34%)	35 (35.7%)	0.249
Antibiotic treatment	18 (34%)	30 (31.3%)	0.676
Diagnosis:			
Recurrent wheezing	28 (52.8%)	32 (32.7%)	0.798
Bronchiolitis	14 (26.4%)	49 (50%)	
Pneumonia	6 (11.3%)	8 (8.2%)	
Upper respiratory infections	3 (5.7%)	5 (5.1%)	
Others	2(3.8%)	2 (3.8%)	
Time in hospital (days)*	4.4 ± 2.8	4.6 ± 2.8	0.713
Fever duration	4.6 ± 2.7	4.3 ± 4.7	0.681
Leucocytes count	13432 ± 5217	14026 ± 5602	0.607
C Reactive Protein	44.5 ± 51.5	41.9 ± 47.9	0.738

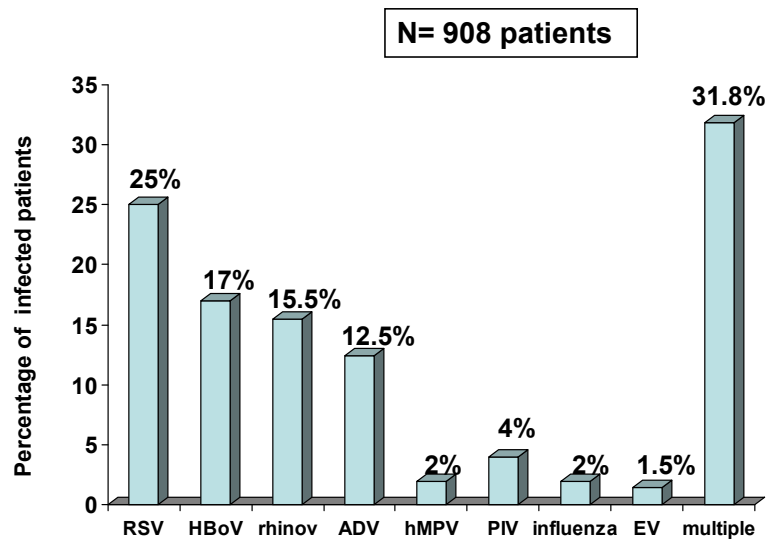


Figure 1. Comparison of the frequency of detection of human bocavirus (HBoV) with other respiratory viral pathogens.

RSV: respiratory syncytial virus
hMPV: human metapneumovirus

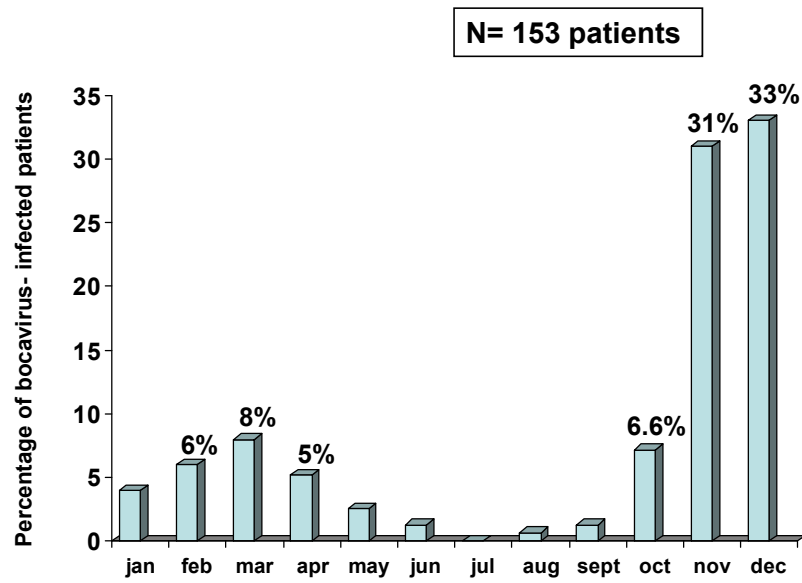


Figure 2. Monthly distribution of HBoV infections

What is already known on this topic

- HBoV is one of the most frequent virus in hospitalized children with lower respiratory tract infections
- The prevalence of HBoV is highest in winter and spring months
- HBoV coinfection with other respiratory viruses is extremely common

What this study adds

- Single HBoV infections are associated with significant clinical manifestations
- Single and dual or multiple HBoV infections are clinically indistinguishable
- HBoV may be detected in asymptomatic children but much less frequently than in children with respiratory infections
- HBoV exhibits a long shedding period of HBoV after an acute respiratory infection

REFERENCES

-
- ¹ Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-724.
 - ² Esper F, Martinello R, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis* 2004;189:1388-1396.
 - ³ Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360:1393-4.
 - ⁴ Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infant in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:2987-91.
 - ⁵ Cuevas LE, Ben Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brasil. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1626-8.
 - ⁶ Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:602-3.
 - ⁷ García-García ML, Calvo C, Martín F, Pérez-Breña P, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41:863-71.
 - ⁸ Allander T, Tammi M, Ericsson A, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:12891-6.

-
- ⁹ Sloots T, McErlean P, Speicher D, Arden K, Nissen M, Mackay I. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Virol* 2005;35:9-102.
- ¹⁰ Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, Kikuta H. Detection of Human Bocavirus in Japanese Children with lower respiratory tract infections. *J Clin Microb* 2006;44:1132-4.
- ¹¹ Foulongne V, Rodière M, Segondy M. Human Bocavirus in children. *Emerg Infect Dis* 2006;12:862-3.
- ¹² Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12: 848-50.
- ¹³ Smuts H, Hardie E. Human Bocavirus in Hospitalized Children, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1457-8.
- ¹⁴ Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194:1276-82.
- ¹⁵ Kaplan N, Dove W, Abu-Zeid A, Shamoon H, Abd-Eldayem S, Hart A. Human Bocavirus Infection among Children, Jordan. *Emerg Infect Dis J* 2006;12:1418-9.
- ¹⁶ Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter G, Halam N, Templeton K et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006; 194:1283-90.
- ¹⁷ Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis*. 2006 Jul 11;6:109.

-
- ¹⁸ Coiras MT, Perez-Brena P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol*. 2003 ;69:132-44.
- ¹⁹ Corias MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004; 72: 484-95.
- ²⁰ López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, García-García ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005;129:1-7.
- ²¹ Pozo F, García-García ML, Calvo C, Cuesta I, Pérez-Breña P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* 2007;40:224-8.
- ²² Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters H, Lehtinen P, Österback R et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44:904-10.
- ²³ Calvo C, García-García ML, Blanco C, Casas I, Pérez-Breña P. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain. *Pediatr Infect Dis J* 2007;10:904-8.
- ²⁴ Papadopoulos NG, Moustki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1285-9.

-
- ²⁵ Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Häusler M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acyl lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microb* 2007;45:1032-4.
- ²⁶ Arnold J, Singh K, Spector S, Sawyer M. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis* 2006;43:283-8.
- ²⁷ Monteny M, Niesters H, Moll H, Berger M. Human bocavirus in febrile children, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2007;1:180-1.
- ²⁸ Subbarao EK, Griffins J, Waner JL. Detection of multiple viral agents in nasopharyngeal specimens yielding respiratory syncytial virus. An assessment of diagnostic strategy and clinical significance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989; 12: 327-332.
- ²⁹ Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. García-García ML, Calvo C, Pérez-Breña P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. *Pediatric Pulmonol* 2006;41:863-71.
- ³⁰ Calvo C, García-García ML, Blanco C, Vázquez MC, Frías ME, Pérez-Breña P, Casas I. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory infections in Spain. *J Clin Virol* 2008 May 1. [Epub ahead of print]

Detection of human bocavirus in ill and healthy Spanish children. A 2-year study.

Archives Disease of Childhood (In press)

Propósito

Tras la descripción inicial de Allander et al varios grupos de investigadores de todo el mundo comenzaron a publicar series de pacientes con infección por HBoV. Tras los primeros resultados fue evidente la elevada frecuencia de coinfecciones de HBoV con otros virus respiratorios, motivo por el que algunos autores han cuestionado el papel patogénico de HBoV y se ha planteado la posibilidad de que pueda actuar como un mero espectador. Raramente se puede establecer el papel causal de un virus con un solo estudio, sino que más bien, son necesarios diversos estudios que, evaluando el comportamiento del virus desde distintas ópticas, permiten establecer hipótesis de causalidad. Por ello, tras nuestra primera serie, en la que se describía la PCR diseñada por nuestro grupo y algunas de las características asociadas a la infección por HBoV en niños españoles, nos planteamos realizar un estudio que profundizara en las manifestaciones clínicas y epidemiológicas asociadas a la infección por HBoV en los niños enfermos a lo largo de dos temporadas epidemiológicas completas.

Pacientes y métodos

Se incluyeron los niños menores de 14 años ingresados por infección respiratoria desde septiembre de 2.004 a diciembre de 2.006. Una vez obtenido el consentimiento informado del padre o tutor, se recogió a todos los niños un aspirado nasofaríngeo, que se trasladó al Laboratorio de Gripe y virus Respiratorios del Instituto Carlos III, donde se realizó una RT-PCR múltiple para VRS-A y B, influenza A, B y C y adenovirus y una segunda RT-PCR múltiple para parainfluenza 1, 2, 3 y 4, rinovirus y coronavirus 229E y OC43. La determinación de hMPV y de HBoV se realizó mediante dos ensayos de nested-PCR diseñadas expresamente al efecto.

Para la recogida de los datos clínicos se siguió la misma metodología comentada en nuestros anteriores estudios.

Resultados

Se incluyeron 908 niños ingresados por alguna infección respiratoria. Se detectó al menos un virus respiratorio en 587 de ellos. De las muestras positivas, 261 (28.7%) eran VRS, 153 (16.8%; IC 95%: 18%, 15.6%) eran HBoV y 141 (15.5%) eran rinovirus. Siete niños tuvieron dos o más muestras positivas para HBoV con un intervalo superior a un mes. Los análisis filogenéticos de las muestras positivas confirmaron que este virus está muy conservado. Se encontró co-circulación de los dos clusters descritos previamente, Sweden ST1-like y Sweden ST2-like. En cada uno de los 7 pacientes con varias muestras positivas, se identificó el mismo virus Sweden ST1-like excepto en uno, cuyas secuencias mostraron ST2-like HBoV en ambas muestras.

Las infecciones por HBoV ocurrieron durante todo el año, aunque fueron especialmente frecuentes en los meses de invierno, seguidos de la primavera. No se encontró variabilidad interanual en la frecuencia de HBoV. La mayoría de los casos eran niños menores de 2 años. Más del 90% de los casos presentaban alguna infección respiratoria de vías aéreas inferiores, precisando más del 50% oxigenoterapia y dos de ellos, ingreso en la unidad de cuidados intensivos. El diagnóstico más frecuente fue episodio de sibilancias recurrentes y/o asma, seguido de bronquiolitis. La fiebre con leucocitosis y elevación de los reactantes de fase aguda fueron muy frecuentes y un tercio de los pacientes recibió tratamiento antibiótico ante la sospecha de infección bacteriana. Tres niños presentaron síntomas cutáneos en forma de exantema petequial, que en dos casos se acompañó de síntomas sistémicos compatibles con cuadro séptico.

La tasa de coinfecciones fue muy elevada. En 99(65%) niños se detectó infección simultánea de HBoV con otro virus respiratorio, siendo los más frecuentes VRS, adenovirus y rinovirus. Las características clínicas de las 54 infecciones sencillas por HBoV fueron similares a las coinfecciones.

Conclusión

Se describe una de las series más grandes de infecciones por HBoV publicadas hasta el momento. Según nuestros resultados, HBoV es el virus más frecuente, después del VRS, en las infecciones respiratorias graves de los niños hospitalizados, especialmente en los menores de dos años. El virus circula a lo largo de todo el año, aunque con dos picos de máxima incidencia en invierno y primavera. Aunque las sibilancias recurrentes y la bronquiolitis son las manifestaciones más frecuentes, la infección por HBoV también se puede asociar con síntomas extrapulmonares. Es extraordinariamente frecuente la coinfección de HBoV con otros virus respiratorios.

La infección por HBoV como agente único se asocia con manifestaciones clínicas significativas e indistinguibles de las infecciones dobles o múltiples.

Se ha detectado HBoV en niños sanos, aunque con una frecuencia significativamente menor que en niños con infección respiratoria aguda.

Estos dos últimos puntos apoyan la hipótesis de que HBoV tiene un papel causal en las infecciones respiratorias de los niños

CLINICAL CHARACTERISTICS OF HUMAN BOCAVIRUS INFECTIONS COMPARED WITH OTHER RESPIRATORY VIRUSES IN SPANISH CHILDREN

Authors

Cristina Calvo PhD¹, Maria Luz García-García MD¹, Francisco Pozo PhD², Olga Carvajal MD¹, Pilar Pérez-Breña PhD², Inmaculada Casas PhD²

¹ Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital. Madrid. Spain

² Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, National Center of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Spain.

Abbreviated title

Human bocavirus infections compared with other respiratory viruses.

Running head title

Human bocavirus infections

Key words

Human bocavirus, respiratory syncytial virus, respiratory infections, infants, children, clinical characteristics.

Corresponding Author:

Cristina Calvo

C/Viento, 5, 5º A. 28760. Tres Cantos. Madrid. Spain.

Telephone number: 0034 91 481 84 60

Fax number: 0034 91 694 07 17

e-mail: ccalvo@mi.madridtel.es

ABSTRACT

Background. Human bocavirus (HBoV) can be found in a substantial proportion of children with respiratory tract diseases. The relative importance of HBoV in viral respiratory tract illnesses is not yet well known.

Objective. This study we looked for HBoV in pediatric patients to determine the incidence of HBoV as single infection, and compared it with other commonly found respiratory viruses in order to describe the clinical differences associated with HBoV infections in children.

Patients & Methods. A prospective study was conducted on children less than 14 years old, admitted with respiratory infection from September 2005 to August 2007 to the Pediatrics Department of the Severo Ochoa Hospital, in Madrid (Spain). We studied the frequency of HBoV and 15 other respiratory viruses in nasopharyngeal aspirates and compared the clinical course of the infections caused by HBoV with those caused by other common respiratory viruses.

Results. Positive results were confirmed in 435 (61.2%) out of the 710 children studied. A single virus was detected in 308 patients. HBoV was found in 99 (13.9%) samples, but it was recovered as a single virus in only 35. Most of patients with HBoV infection (75%) were aged ≤ 26 months. The most common clinical diagnosis was recurrent wheezing (53%) followed by bronchiolitis (32%). Clinical differences were observed between HBoV and RSV infections (children were older and bronchiolitis less frequent), adenovirus (fever less frequent in HBoV group) and rhinovirus associated infections (less hypoxia in HBoV group).

Conclusions: HBoV was the fourth most frequent single virus after RSV, rhinovirus and adenovirus in children hospitalized because of respiratory infection. It was associated with recurrent wheezing and bronchiolitis showing a different clinical course from other virus in terms of diagnosis, fever and age.

INTRODUCTION

Since the detection of human bocavirus (HBoV) from respiratory tract samples from Swedish infants and children with lower respiratory tract disease¹, several series have been published around the world^{2,3,4,5,6,7,8,9,10}. In most of these groups HBoV is found most often in patients aged between 6 months and 4 years with upper and lower respiratory tract infections. HBoV is detected throughout the year although the frequency is somehow increased during the winter months. In addition, a high rate of coinfections with other viral agents is frequently observed. There are still many open questions in the knowledge of this virus and its circulation. Given the high proportion of coinfection associated with HBoV (up to 56% and 72%)^{2, 8}, its role as a true causal agent in respiratory pathology has been questioned. We designed a study with the objective of describing the clinical impact and the clinical characteristics of HBoV as a single infection in Spain. In order to determine whether HBoV infections have some singular characteristics, HBoV-single infections were compared with the most prevalent respiratory virus-single infections in the same population.

PATIENTS AND METHODS

This was a substudy of an ongoing prospective investigation of respiratory tract infections in children, funded by FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias – Spanish Health Research Fund) Grants N°: 98/0310,PI06/0532 and approved by The Medical Ethics Committee.

Clinical assessment

The study population were children, less than 14 years of age, with respiratory tract infection who were admitted to the secondary public hospital Severo Ochoa (Leganés, Madrid), between September 2005 and August 2007 (patients recruited between

September 2005 and August 2006 were included in a previous study¹¹). Informed consent was obtained from parents or legal guardians. All patients were evaluated by an attending physician.

During the hospital stay, and as part of the study, a physician filled out a study-questionnaire with the following variables: age, sex, clinical diagnosis, history of prematurity and underlying chronic diseases, need for oxygen therapy assessed by transcutaneous oxygen saturation, axillary temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$, presence of infiltrate/atelectasis in radiographs, administration of antibiotic therapy, duration of hospital stay, total white blood cell (WBC) count, C-reactive protein (CRP) serum values, and result of blood culture when it was done. In this study, asthma - or recurrent wheezing - was not considered a chronic underlying disease. Oxygen therapy was provided in order to achieve oxygen saturation $>$ or equal to 94%.

Upper respiratory tract infection (URTI) was defined as the presence of rhinorrhea and/or cough in the absence of wheezing, dyspnea, crackling rales or bronchodilator use, with or without fever. The classic criteria, present in an initial episode of acute onset expiratory dyspnea with previous signs of viral respiratory infection - whether or not this was associated to respiratory distress or pneumonia - were applied in diagnosing *bronchiolitis*¹². Children with wheezing, breathlessness and obstruction of the airways, in whom similar episodes had previously been diagnosed and treated by a physician, were diagnosed as *recurrent wheezing*. Cases with focal infiltrates and consolidation in chest radiographs, in the absence of wheezing, were classified as *pneumonia*.

Virus detection

Specimens from patients consisted of nasopharyngeal aspirates (NPA) taken from each patient at admission (Monday through Friday). Each specimen (one for each patient) was sent for virologic investigation to the Influenza and Respiratory Virus Laboratory at the National Microbiology Center (ISCIII, Madrid, Spain). Specimens were processed within 24 hours after collection. Upon receipt of NPA, 300 μl samples

were aliquoted in the Sample Reception Unit, where a total of 3 aliquots were prepared and stored at -70°C. The reception area and the NPA sample aliquoting area were separate from the working areas.

Nucleic acid extraction

Total nucleic acids from 200 µl aliquot of clinical specimens were automatically extracted using the BioRobot M48 workstation and the MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for PCR assays. A cloned amplified product of a DNA fragment supplied by the Promega Access RT-PCR system kit (Promega) was obtained and added to the lysis buffer as an internal control for checking both the efficiency of acid nucleic extraction and presence of amplification inhibitors. Internal control was quantified in such a way a total of 100 molecules per tube were included.

PCR methods for detection of HBoV and fifteen other respiratory viruses

Nucleic acids extracted from all NPAs were tested for HBoV using a sensitive and specific nested PCR method described previously¹¹. Influenza virus A, B and C, RSV A and B and adenoviruses were detected by using a multiplex RT-nested PCR¹³, and parainfluenza viruses 1 to 4, human coronaviruses 229E and OC43, enteroviruses and rhinoviruses by using a second multiplex RT-nested PCR¹⁴ as described previously by our group. hMNv was investigated in all samples using a RT-nested PCR designed in matrix gene¹⁵.

Appropriate precautions were implemented to avoid false positive results by carryover contamination. Positive results were confirmed by testing a second aliquot of sample.

Statistical analysis

Clinical characteristics of infections associated to HBoV were compared with those associated with RSV, adenovirus and rhinovirus infections. Patients with multiple infections were excluded from the analysis. Values were expressed as percentages for discrete variables, or as mean and standard deviation for continuous variables. Clinical characteristics and laboratory variables were compared using the Student *t* test, the

Mann-Whitney U test, the χ^2 test, and Fisher's exact test. A two-sided value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Version 13.0.

RESULTS

Screening of virus and patient characteristics

The study population consisted of 806 hospitalized children younger than 14 years, with acute respiratory infection. Since 86 patients were excluded either because of lack of NPA clinical samples or because they refused to participate, a total of 710 infectious episodes were analyzed. At least one respiratory virus was detected in 435 samples (61.2%), of which 308 samples corresponding to 308 episodes were single virus infections (70.8%), and 127 were dual or multiple viral infections (29.2%). Excluding coinfections, all viruses detected are listed in Table 1 in descending order of frequency. HBoV was detected in 99 patients (13.9%) corresponding to 35 single virus infections (35.4%) and 64 multiple virus infections (64.6%). All patients with single infections were younger than 7 years. Multiple virus infections with HBoV are also described in table 1.

Clinical findings associated with the presence of HBoV, RSV, rhinovirus and adenovirus

Clinical characteristics of the 35 single virus bocavirus infections compared with the single infections associated to the most prevalent viruses detected, RSV ($n=131$), rhinovirus ($n=66$) and adenovirus ($n=40$), are shown in Table 2.

HBoV versus RSV

Thirty-five patients with HBoV infection were significantly older ($p= 0.017$) than those with RSV infections ($20,8 \pm 25$ vs $9,76 \pm 13$ months). Half of patients with HBoV were less than 12 months old (range between 1 to 147 months) and half of patients with RSV

infection were less than 5 months old (ranged between 1 to 86 months). Table 3 shows age differences among groups. Bronchiolitis was observed more frequently in the RSV group ($p=0.0001$) than in HBoV infected patients (Table 2). To rule out the confounding factor of younger age when diagnosing bronchiolitis in RSV infected children, the sample was stratified below and above the median age (297 days). For the group less than 297 days old, the statistical significance ($p<0,005$) was maintained for the diagnosis of both viruses and bronchiolitis. Serum C reactive protein (CRP) and white blood cell count were higher in the HBoV group.

HBoV versus adenovirus

The patients with adenovirus infections had higher fever ($p=0.036$), and received antibiotics as treatment significantly more often ($p=0.009$) than the HBoV group. Bronchiolitis was less frequently diagnosed in the adenovirus group ($p= 0.017$) and CRP had higher values in HBoV group ($p= 0.043$).

HBoV versus rhinovirus

With exception of hypoxia, no significant clinical differences were found between HBoV and rhinovirus infections. Patients with rhinovirus infection required administration of oxygen less frequently than HBoV group (39,4% RV vs 62,9% HBoV, $p=0,0025$).

DISCUSSION

According to our results, HBoV circulates in Spain with a very high incidence. In our study population (hospitalized children), we were able to identify HBoV in 99 children, yielding a frequency rate of 13.9%, almost one-third of which (35/99) was as a sole pathogen. HBoV ranked fourth of all viruses involved in single virus respiratory infections (Table 2).

In the original series described by Allander et al¹, the detection rate of HBoV was 3.1%. Soon after, new reports from Australia², Japan³, Canada⁵ and France⁴ were published, with HBoV frequencies of 5.6%, 5.7%, 1.5% and 4.4% of respiratory infections respectively. However, in two studies performed in Germany¹⁰ and South

Africa⁶ in hospitalized children, HBoV was identified in 10.3% and 11% of studied samples. Recently another two series have been described. In a study from Jordan, HBoV was detected in 57(18.3%) of 312 children with acute respiratory infection severe enough to require hospital admission⁸, and in the second one, in Finland, an incidence of HBoV infection of 19% in hospitalized children with acute expiratory wheezing was reported¹⁶. These differences could be explained because some studies have investigated the frequency of HBoV only in children for whom respiratory specimens were negative for other respiratory viruses^{3, 7}. Given the high proportion of coinfections found in the Swedish (76%)¹⁶ and the Australian (55%)² series, it is likely that the true frequency of HBoV was underestimated if its presence was studied only in samples testing negative for other respiratory viruses. Our group has published previous series with a HBoV frequency of 13.4 and 17%, (60% and 71% respectively, of them coinfections)^{11,17}.

A major strength of this study is the use of a panel of sensitive PCR assays^{11,13,14}, for a complete range of respiratory viruses during two full calendar years (except for coronaviruses NL63, HkU1 and recently identified viruses such polyomavirus KIV, and WUV). In the Australian series² HBoV was the second most frequent virus, but PCR for rhinovirus was not performed. Previous studies have shown that rhinovirus is one of the most frequent agents in pediatric respiratory infections, only after RSV^{18,19}. In this study, we also evaluated the presence of rhinovirus and it was the second virus in frequency. Adenovirus and HBoV were very close in third and fourth position respectively.

HBoV infections differ from other respiratory infections in several aspects and features. Our study indicates an association between HBoV infection and lower respiratory tract infections on the basis of its frequent detection in samples obtained from individuals hospitalized with acute respiratory illness. The most common reason for HBoV-infected children to be hospitalized was exacerbation of asthma followed by bronchiolitis. RSV is associated with bronchiolitis more frequently and the age of the

patients is lower than in HBoV infected children. Leukocytes and RCP values are higher in HBoV infected patients. If we compare HBoV infections with those caused by adenovirus, bronchiolitis is less common in patients with infection caused by adenovirus. They have higher temperature and, perhaps for this reason, these patients received antibiotic therapy more frequently than the HBoV group. Infections caused by HBoV and rhinovirus have a similar profile in most of the analysed features, perhaps because both cause asthma or recurrent wheezing in children of comparable age. However children with infections caused by rhinovirus received oxygen therapy less often than those infected by HBoV.

Proof of causality is difficult to demonstrate and rarely emerges from one study, but depends on the accumulation of evidence²⁰. Nevertheless our work found different clinical characteristics in infections associated with HBoV compared with those caused by other respiratory viruses. This supports the idea that HBoV is a frequent cause of respiratory diseases in children. The absence or infrequency HBoV detection in healthy children also supports the pathogenic role of this virus in respiratory diseases in children. In the study of Kesebir et al²¹ none of 96 asymptomatic children, tested positive for HBoV. Our group has conducted a study in 116 healthy children and HBoV was found in 2% of these children as a single infection²².

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Spanish National Health Institute (ISCIII, Fondo de Investigaciones Sanitarias) grants 98/0310 and PI06/0532

Table 1. Frequency of viruses detected in 308 children hospitalized for respiratory disease with any single virus and frequency of coinfections by human bocavirus.

Single Virus	N (%)
Respiratory syncytial virus	131 (42.5%)
Rhinovirus	66 (21.4%)
Adenovirus	40 (12.9%)
Bocavirus	35 (11.3%)
Parainfluenza	15 (4.8%)
Influenza	11 (4.6%)
Human Metapneumovirus	10 (3.2%)
Total	308 (100%)

Human bocavirus coinfections	N= 64
Dual infections	53
Triple infections	19
Respiratory syncytial virus	34
Adenovirus	20
Rhinovirus	19
Parainfluenza	8
Enterovirus	2

Table 2. Clinical characteristics associated with infections caused by bocavirus (HBoV) compared with respiratory syncytial virus (RSV), adenovirus (ADV) and rhinovirus (RV) (significant differences are in bold).

Clinical feature	HBoV (n= 35)	RSV (n=131)	ADV (n=40)	RV (n=66)
Male	21 (60%)	69 (52.7%)	22(55%)	41(66%)
Prematurity	7 (20%)	18 (13.7%)	3 (7.7%)	11(16.7%)
Temperature > 37.9°C	25 (71%)	98 (75.4%)	26 (68.4%)	35 (53%)
Hypoxia (SatO ₂ <95%)	22 (62.8%)	84 (64.6%)	17 (44.7%)	26 (39.4%)⁹
Abnormal chest radiograph	14 (40%)	46 (35%)	22 (56.4%)	19 (28.8%)
Antibiotic treatment	10 (28.6%)	23 (17.6%)	23 (59%)¹	16 (22.7%)
Diagnosis:				
Asthma/ recurrent wheezing	18 (52.9%)	40 (31.5%)²	23 (67.6%)	31 (58.5%)
Bronchiolitis	11 (32.4%)	82 (64.6%)²	3 (8.8%)³	13 (24.5%)
Pneumonia	5 (14.7%)	5 (3.9%)	8 (23.5%)	9 (17%)
Highest temperature	38 ± 0.32	38.45 ± 0.89	38.7 ± 0.18⁴	38.3 ± 0.96
Leucocytes (cells/mm ³)	13634 ± 2013	12300 ± 488⁵	18200± 1145	16212±9307
Serum C reactive protein	73 ± 93	35.8 ± 50⁶	47.05 ± 54⁷	77.6± 112
Age (months)	20.8±25	9.76±13⁸	23.7±24	21.7± 27
Hospital stay (days)	4.1±2.3	4.8±2.2	4.1±2.3	3.6±1.6
Fever duration (days)	3.4±2.4	3.8±4.6	4.4±2.8	2.5±2.1
Hypoxia duration (days)	2.2±1.5	2.4±1.8	3±2.8	1.9±1.2

(1) p= 0.009, (2) p= 0.0001, (3) p= 0.017, (4) p= 0.036, (5) p= 0.042, (6) p= 0.003, (7) p= 0.043, (8) p= 0.017, (9) p= 0.025

Table 3: Age (months) of patients with infection associated with bocavirus (HBoV), respiratory syncytial virus (RSV), adenovirus (ADV) and rhinovirus (RV).

Age (months)	HBoV	RSV	ADV	RV
Mean	20,8±25	9,76±13*	23,7±24	21,7±27
Median	12	5	19	10
Percentiles				
25	8	2	11	3
50	12	5	24	10
75	25	12	33	28
Range	1-147	1-86	3-113	1-148

*p = 0,017

REFERENCES

-
- ¹ Allander T, Tammi M, Ericsson A, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:12891-6.
- ² Sloots T, McErlean P, Speicher D, et al. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Virol* 2005;35:9-102.
- ³ Ma X, Endo R, Ishiguro N, et al. Detection of Human Bocavirus in Japanese Children with lower respiratory tract infections. *J Clin Microb* 2006;44:1132-4.
- ⁴ Foulongne V, Rodière M, Segondy M. Human Bocavirus in children. *Emerg Infect Dis* 2006;12:862-3.
- ⁵ Bastien N, Brandt K, Dust K, et al. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12: :848-50.
- ⁶ Smuts H, Hardie E. Human Bocavirus in Hospitalized Children , South Africa. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1457-8.
- ⁷ Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194:1276-82.
- ⁸ Kaplan N, Dove W, Abu-Zeid A, et al. Human Bocavirus Infection among Children, Jordan. *Emerg Infect Dis J* 2006;12:1418-9.
- ⁹ Manning A, Russell V, Eastick K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006; 194:1283-90.
- ¹⁰ Weissbrich B, Neske F, Schubert J, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis*. 2006 Jul 11;6:109.
- ¹¹ Pozo F, García-García ML, Calvo C, et al. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol*. 2007; 40: 224-28 .

-
- ¹² McConnochie K. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child* 1983; 137: 11-13.
- ¹³ Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, et al. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol*. 2003 ;69:132-44.
- ¹⁴ Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, et al. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004 ;72:484-95
- ¹⁵ López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, et al. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 2005;129:1-7.
- ¹⁶ Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44:904-10.
- ¹⁷ García-García ML, Calvo Rey C, Vázquez Alvarez MC, et al. Infecciones por bocavirus humano en niños Españoles: características clínicas y epidemiológicas de un virus respiratorio emergente. *An Pediatr (Barc)*; 2007; 67: 212-9.
- ¹⁸ Calvo C, García-García ML, Blanco C, et al. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract disease in Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 ;26:904-8.
- ¹⁹ Papadopoulos NG, Moustki M, Tsolia M, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1285-9.
- ²⁰ McIntosh K, Human bocavirus: developing evidence for pathogenicity. *J Infect Dis*.2006;194:1197-9.
- ²¹ Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, et al. Human Bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194:1276-82

²² García-García ML, Calvo C, Pozo F, et al. Human Bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:358-60.

Clinical characteristics of human bocavirus infections in Spanish children compared with other respiratory viruses

Pediatric Infectious Disease Journal 2008 Jun 19 (Epub ahead of print)

Propósito

Los estudios llevados a cabo hasta ahora han puesto de manifiesto la elevada frecuencia con la que HBoV coinfecta con otros virus respiratorios, alcanzando en algunas series el 72%. Precisamente este punto ha motivado que se ponga en duda el papel patogénico de este nuevo virus, que a la luz de estos datos, podría actuar como un simple espectador, acompañando a otros virus respiratorios que serían los auténticos responsables de las manifestaciones clínicas. Para intentar aclarar este punto pensamos que sería importante investigar si la detección de HBoV como agente único en el aspirado nasofaríngeo, se asocia o no con manifestaciones clínicas significativas. Con este objetivo pusimos en marcha este estudio diseñado para comparar la prevalencia y las características clínico-epidemiológicas de las infecciones sencillas por HBoV con las de los principales virus respiratorios.

Pacientes y métodos

Se incluyeron todos los niños menores de 14 años ingresados por infección respiratoria en el Servicio de Pediatría del Hospital Severo Ochoa entre septiembre de 2.005 y agosto de 2.007, cuyos padres consintieron en participar. Para la recogida de los datos clínicos, se siguió la metodología descrita en nuestros estudios previos. Se recogió a todos los niños un aspirado nasofaríngeo, que fue trasladado al Laboratorio de Gripe y Virus Respiratorios del Instituto Carlos III, para la detección, mediante PCR, de VRS A y B, influenza A, B y C, adenovirus, parainfluenza 1, 2, 3 y 4, rinovirus, coronavirus humano 229E y OC43, hMPV y HBoV.

Resultados

La población de estudio consistió en 710 niños menores de 14 años, hospitalizados con infección respiratoria aguda. Se detectó al menos un virus respiratorio en 435 muestras (61.2%). 308 fueron infecciones sencillas y 127(29%) fueron infecciones dobles o múltiples. Se identificó HBoV en 99 casos, 35 como infección sencilla y 64 como infección múltiple (64,6%). Todos los niños con infección sencilla eran menores de 7 años.

En comparación con las infecciones sencillas por VRS, las infecciones sencillas por HBoV afectaron a niños de mayor edad ($p<0,001$) y se asociaron más frecuentemente con el diagnóstico de episodio recurrente de sibilancias ($p<0,001$). Los niños con infección sencilla por adenovirus presentaron más fiebre ($p= 0,036$) y recibieron más frecuentemente antibióticos que el grupo HBoV ($p=0,009$). Además, los niños con HBoV fueron diagnosticados más frecuentemente de bronquiolitis ($p=0,017$) que los infectados por adenovirus. Por el contrario, la única diferencia significativa encontrada entre el grupo HBoV y el grupo rinovirus fue la mayor frecuencia de necesidad de oxigenoterapia del grupo HBoV ($p=0,002$).

Conclusión

Se demuestra que el aislamiento de HBoV como único agente en el aspirado nasofaríngeo, no sólo se asocia con manifestaciones clínicas suficientemente graves como para requerir ingreso hospitalario, sino que incluso tiene algunas características diferenciales con respecto a los virus respiratorios clásicos. Estos datos, junto a la diferente frecuencia de detección de HBoV en niños sanos y enfermos, apoyan la idea de que HBoV puede jugar un papel patogénico fundamental en la etiología de las infecciones respiratorias graves de los niños.

Role of Rhinovirus in Hospitalized Infants With Respiratory Tract Infections in Spain

Cristina Calvo, PhD,* Maria Luz García-García, MD,* Carolina Blanco, MD,*
Francisco Pozo, PhD,† Inmaculada Casas Flecha, PhD,† and Pilar Pérez-Breña, PhD†

Background: Rhinovirus is a recognized cause of common cold, proven to cause asthma exacerbations in children. In Spain, no description exists, as yet, as to the degree of burden rhinovirus infections represent among hospitalized infants. Our aim was to describe rhinovirus infections in hospitalized children, under 2 years of age, and to compare these with patients infected with respiratory syncytial virus (RSV).

Patients and Methods: The prospective study was performed between September 2003 and July 2005, in children <2 years of age, admitted at the Severo Ochoa Hospital (Leganés, Madrid) with fever or respiratory tract infection and with positive rhinovirus detection in the nasopharyngeal aspirate samples. Virologic diagnosis was made by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction and for some virus by direct immunofluorescent assay in nasopharyngeal samples. Demographic and clinical data of those patients with rhinovirus infection were described and compared with a group of 86 patients, infected only with RSV, randomly selected from the same population.

Results: We detected 85 children admitted to hospital with rhinovirus infection. Rhinovirus was the cause of 25% of all admissions, among the total of 340 under 2-year olds diagnosed with fever or respiratory tract infection. Rhinovirus was the second viral agent identified, after RSV. Clinical diagnosis was recurrent wheezing in 48.2%; bronchiolitis in 36.5%; and pneumonia in 3.5%. Fever was present in 60% of the patients. Radiologic infiltrates were found in 22.4% of the children. In 50.6% of the infants, oxygen saturation under 95% was detected, at the time of admission. Hypoxia was present in RSV-infected children more frequently ($P = 0.005$). Also, in this group, final diagnosis was, most frequently, bronchiolitis ($P = 0.0001$), and rhinovirus-infected patients were most frequently males ($P = 0.004$).

Conclusions: Rhinovirus was detected in hospitalized infants with respiratory tract disease and was the second most common virus after RSV. In our experience, it was the second etiologic agent associated with recurrent wheezing in hospitalized children, under the age of 2 years.

Key Words: infants, influenza, respiratory tract infection, rhinovirus, respiratory syncytial virus

(*Pediatr Infect Dis J* 2007;26: 904–908)

Rhinoviruses (RV) are the most common cause of upper respiratory tract infections in both adults and children. In adults, RV infections account for approximately 50% of common colds and could account for up to 80% or more of all infections during epidemic outbreaks.^{1,2} Rhinovirus infections are more frequent among children than among adults. Almost all children have experienced at least one rhinovirus infection by the age of two.³ Given the technical difficulties involved in isolating rhinovirus in cell cultures, it has only been in recent years, with the detection of viral genomes via reverse transcription polymerase chain reaction in nasopharyngeal aspirates (NPA), that we have developed a clearer understanding of the impact of these infections in other situations. As a result, RV may now be considered a major cause of lower respiratory tract infections in infants⁴ and of asthma-triggering in children^{5–9} and in adults.^{10,11} In patients with chronic bronchitis,¹² they are also considered causal agents in exacerbations of many types of preexisting airways disorders.

Respiratory syncytial virus (RSV) infections are the principal cause of respiratory disease-related morbidity and hospitalization in children under 2 years of age. Such is its importance within this age-group and the role it plays in the development of recurrent wheezing and asthma in early childhood, that it has eclipsed the impact of other agents, such as rhinovirus and human metapneumovirus. In addition, the technical difficulties involved in detecting these viruses, which grown poorly in cell cultures, made difficult the knowledge of the real incidence of these viruses in the respiratory infections. Although more and more papers exist on the importance of rhinovirus in respiratory pathology, there is still a lack of data regarding its relevance in infections during infancy.

Our aim was to describe rhinovirus infections in children <2 years of age admitted to hospital with respiratory tract infection, by conducting a prospective study over 2 consecutive years. Within the same population, we compared clinical characteristics of infections by rhinovirus with infections by RSV.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples. This was a substudy of an ongoing prospective investigation on respiratory tract infections in

Accepted for publication May 29, 2007.

From the *Pediatrics Department, Severo Ochoa Hospital, and †Influenza and Respiratory Viruses Laboratory, Virology Service: ISCIII National Microbiology Center, Madrid, Spain.

Address for correspondence: Cristina Calvo, C/Viento, 5, 5º A, 28760 Tres Cantos, Madrid, Spain. E-mail: ccalvo@mi.madridel.es.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0891-3668/07/2610-0904

DOI: 10.1097/INF.0b013e31812e52e6

children <2 years of age. The study was conducted at the Severo Ochoa Hospital Pediatrics Department, Madrid, Spain. All children recruited were under 2 years of age, consecutively admitted to our hospital for acute respiratory infections, from September 2003 to July 2005. The children's parents were duly advised, upon admission, that clinical data might be used for clinical research purposes. Furthermore, in each case, informed verbal consent was obtained from each of the parents or legal guardians. The study was approved by the ethics committee.

NPA were taken from each of the patients, upon admission, and sent to the Influenza and Respiratory Viruses Laboratory at the National Centre for Microbiology (ISCIII), Madrid, Spain. Samples were processed for virologic study within 24 hours of collection.

Two independent aliquots of 200 μ L each were done; one of them was immediately processed and the second one was stored at -80°C for confirmation of results. All NPAs were tested for influenza virus A, B, and C, RSV A and B, and adenovirus by indirect immunofluorescence, virus isolation, and multiplex RT-nested PCR.¹³ Samples were also tested for parainfluenza viruses 1 to 4, human coronaviruses 229E and OC43, enteroviruses, and RV by a second multiplex RT-nested PCR.¹⁴ Human metapneumovirus was investigated in all samples using a RT-nested PCR designed in matrix gene.¹⁵

Nucleic acids from a total of 200 μ L of clinical specimens were automatically extracted using the BioRobot M48 workstation and the MagAttract Virus Mini M48 Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Clinical Assessment and Statistical Analysis. Throughout each child's time in hospital, one of the physicians directly involved in the study used questionnaires in recording the following variables: age, sex, month of admission, clinical diagnosis, history of prematurity and underlying chronic diseases, need for oxygen therapy (evaluated via transcutaneous oxygen saturation), axillary temperature ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), presence of infiltrates and/or atelectasis in chest radiographs, administration of antibiotic therapy, length of hospital stay, total white blood cell (WBC) count, C-reactive protein (CRP) serum levels, and blood culture results (for those cases where such tests had been performed). Asthma, or recurrent wheezing, was not considered an underlying chronic disease.

Upper respiratory tract infection was diagnosed in patients with: rhinorrhea and/or cough, no signs of wheezing, dyspnea, crackles, or bronchodilator use, with or without fever. Classic criteria were applied in diagnosing bronchiolitis¹⁶: first-time episode of expiratory dyspnea, with acute onset and prior signs of viral respiratory infection—whether or not these were associated to respiratory distress or pneumonia. Children known to have had previous similar episodes of wheezing or breathlessness or airways-obstruction-related respiratory infections were diagnosed with *recurrent wheezing*. Where there was no wheezing, cases in which the chest radiograph showed focal infiltrates with consolidation were classified as *pneumonia*. Children with cold symptoms associated with inspiratory stridor were classified as *acute laryngitis*.

To compare the clinical characteristics associated with rhinovirus and RSV infections, a sample of 88 hospitalized infants with documented RSV infection, aged <2 years, was randomly selected from the same population. Excel data-analysis functions were used to perform simple random sampling.

Values were expressed as percentages for discrete variables, or as mean and standard deviation for continuous variables. Clinical characteristics and laboratory variables were compared using the Student's *t* test, the Mann-Whitney *U* test, the χ^2 test, and Fisher's exact test. A 2-sided value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Version 11.0.

A total of 382 children were hospitalized with respiratory tract infection. No significant age, sex, or diagnosis differences were found between the excluded patients and the study group.

RESULTS

Study Population. Between September 2003 and July 2005, we studied a total of 382 children <2 years of age admitted to hospital with respiratory tract infection. We obtained NPA samples and clinical data for 340 cases (89% of the hospitalized children). Out of the 340 analyzed samples, 244 virus-positive cases (71.7%) were identified. Rhinovirus was found in 85 samples, corresponding to 85 episodes in 81 children: ie, 25% of all hospitalized infants. RSV was the most common causal agent, which meant 41.5% of all virus-positive cases, followed by rhinovirus (34.8%), adenovirus (8.3%), influenza (6.5%), and human metapneumovirus (5.9%). Multiple viral infections were detected in 58 patients (23.8%, most of them dual infections), and there were 3 or more simultaneous agents found in 3% of our study population.

Clinical Characteristics of "Rhinovirus-Associated" Infections. Mean age for the children with rhinovirus infection was 7.59 (± 6.3 months), and 67.1% of the patients was males. Dual or multiple infections were isolated in 34 out of the 85 cases (40%), with RSV and adenovirus standing out as the more frequently identified agents (Table 1). There were rhinovirus infections present in 2 peaks of incidence: in spring (February to March) and in early fall (Fig. 1).

Final clinical diagnosis for patients with rhinovirus detections were as follows: recurrent wheezing (48.2% of the cases), bronchiolitis (36.5%), upper respiratory tract infection

TABLE 1. Viral Agents Identified in Children With Rhinovirus Infections (n = 85)

Viral Agents	No. of Patients (%)
Single infection	51 (60)
Coinfection	34 (40)
RSV	11
Adenovirus	11
Parainfluenza	6
Metapneumovirus	4
Others	2

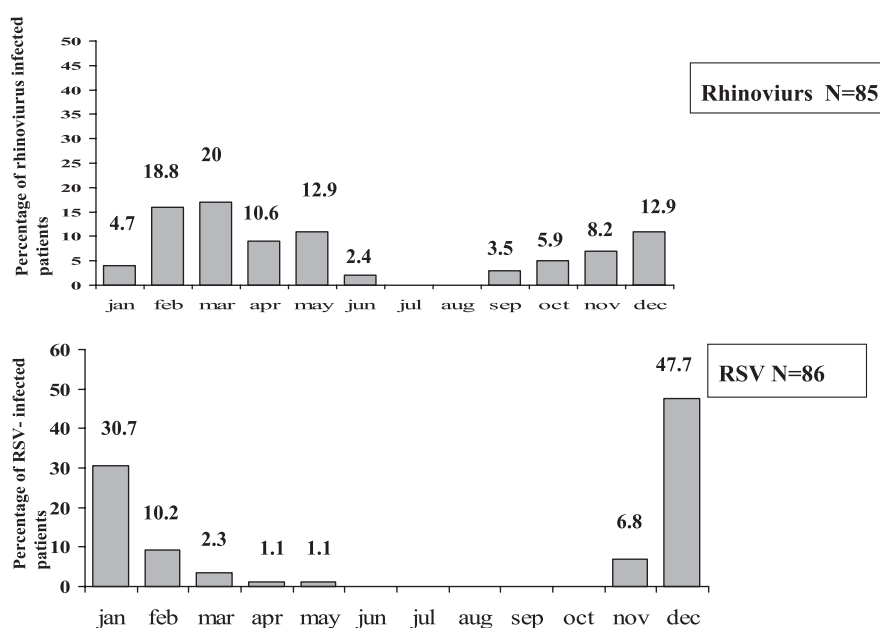


FIGURE 1. Monthly distribution of rhinovirus and respiratory syncytial virus single infections.

(8.2%), and pneumonia (3.5%). Fever $>38^{\circ}\text{C}$ was present in 60% of the children (mean, 38.5°C (± 0.6)). CRP tests were conducted on 49 patients, and the mean value was 48.9 mg/dL (± 66) (range, 2–275; mean value, 19). Mean WBC count was 13,242 (± 5707)/mm³ (carried out on 58 patients). Abnormal chest radiographs (infiltrate versus atelectasis) were found in 19 cases (22.4%). Hemocultures were negative in all of the cases. As a result of transcutaneous pulse oximetry, 57.1% of the children required oxygen administration ($<95\%$) (average duration of therapy, 2.9 (± 2.6) days). Length of hospital stay was 4.78 (± 3.37 days) (range, 1–17 days). One child was admitted into intensive care because he required thoracic drainage to treat a parapneumonic pleural effusion: the patient presented a dual infection with coronavirus. Eighteen patients received antibiotic treatment during their hospital stay (21.2%). Fifteen children (17.6%) had been born prematurely, after <37 weeks gestation.

Patients with single infections associated with rhinovirus ($n = 51$) were analyzed and compared with patients infected by rhinovirus and other agents ($n = 35$). Children with single rhinovirus infection were more frequently male (76.5% versus 52.9%, $P = 0.034$). No significant differences were found in other analyzed variables.

Comparison With the RSV-Positive Group. Clinical data taken from patients with single rhinovirus infection ($n = 51$) were compared with data of 86 RSV infected patients, selected at random from the same population.

Rhinovirus-infected patients were, more frequently, males (76.5% versus 59.3%, $P = 0.004$). They needed oxygen-therapy less frequently (43.1% versus 61.6%, $P = 0.05$). Chest roentgenograms were done more frequently among the RSV group (96.5% versus 69.6%, $P = 0.0001$). Nevertheless, the percentage of infiltrate/atelectasis present in radiographs was similar in both groups. Final diagnosis was different. Bronchiolitis was more frequent in the RSV group ($P = 0.0001$). No significant differences were found between

groups regarding age, length of hospital stay, absolute WBC, and CRP values (Table 2).

DISCUSSION

Our results show that RV are the second most frequently active agents in respiratory infections requiring hospitalization among infants under 2 years of age.

RSV is the most commonly identified agent in infants with bronchiolitis and recurrent wheezing. The role of RV in lower respiratory tract infections in young children has been underestimated because traditional methods for RV detection were less sensitive than those used for the detection of RSV and other respiratory viruses. Recently, polymerase chain reaction methods have been developed for RV^{17,18} and these methods allowed for detection of viral genome of RV, increasing the incidence of these viruses as the second agents associate to bronchiolitis¹⁹ and recurrent wheezing²⁰ precipitant in infants. Furthermore, some authors have assessed the contribution of rhinovirus infections during infancy to the development of subsequent wheezing in early school-age.²⁰ They discovered that contracting respiratory tract diseases associated with rhinovirus (ie, conditions requiring hospitalization during infancy) implied a risk factor for developing asthma (odds ratio, 4). This association was 4 times greater than in patients hospitalized with an RSV infection. In children from birth to 3 years of age, Lemanske et al²¹ found that the most significant risk factor in the development of pre-school childhood wheezing to be the occurrence of a symptomatic rhinovirus illness during infancy. The odds ratio was 6.6, higher than those established for RSV-associated infections. The burden of rhinovirus illnesses would, therefore, seem to be far greater than had, till now, been acknowledged.

Our data are consistent with other literature. In our series, RV are the second agent linked to viral respiratory tract infections in hospitalized children under the age of 2

TABLE 2. Clinical Characteristics of Patients With Single Rhinovirus Infection (RV) and Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infections

Variable	RV N = 51	RSV N = 86	P	OR
Males	39 (76.5)	51 (59.3)	0.043	2.2 (1.02–4.8)
Age (mo)	6.89 ± 6	6.16 ± 5.2	NS	—
Temperature ≥38°C	30 (58.8)	47 (54.7)	NS	—
Hypoxia	22 (43.1)	53 (61.6)	0.05	0.47 (0.23–0.95)
Chest radiograph	35 (69.6)	83 (96.5)	0.0001	—
Infiltrate/atelectasis	10 (19.6)	31 (37.3)	NS	—
Diagnosis				
Bronchiolitis	14 (27.5)	61 (70.9)	0.0001	0.2 (0.08–0.45)
Recurrent wheezing	24 (47.1)	21 (24.4)	—	—
Prematurity	8 (15.7)	9 (10.5)	NS	—
WBC/mm ³	13,223 ± 5707	12,047 ± 5171	NS	—
Serum CRP	44.7 ± 67	55 ± 108	NS	—
Time in hospital (d)	4.49 ± 3.5	4.8 ± 5	NS	—

Values inside parentheses indicate percentages.

CRP indicates C-reactive protein; RV, rhinovirus; NS, non significant; OR, odds ratio; WBC, absolute blood white cell value.

(25%). Rhinovirus infections are similar for RSV infections and are associated to bronchiolitis and recurrent wheezing. Our series could help to clarify the burden of rhinovirus infections in hospitalized infants.

In a recently published series on Finnish children of all ages (symptoms: wheezing; span: almost 2 complete epidemiologic seasons), Jartti et al²² establish the role of the various viruses as asthma-generating agents. In this series, RSV was the most prevalent virus up to the age of 1, whereas picornaviruses (enterovirus and rhinovirus) became particularly prevalent among children over the age of 3 (present in 82% of all asthma crises). They also account for 4% of infections by metapneumovirus (as high as 11%, in the 0–12 month age bracket). These results are very similar to our own.

If a wide range of viruses is tested by our multiplex RT-nested PCR assays 14 different viruses, multiple viral infections represent an important fraction of the cases (19.5%, Papadopoulos et al¹⁹), and rhinovirus is one of the most frequently involved agents that has correlated with a higher clinical severity. In our series, multiple viral infections (including rhinovirus) affected 39.5% of the overall study population, well above the levels reached in other published series, probably due to the wide range of viruses analyzed.

The role of simultaneous presence of viral pathogens in respiratory diseases has not been properly established. Some authors consider that multiple viral infection increases disease severity (or that, at the very least, they can influence the natural history of the illness¹⁹), whereas others have found no clinical differences between simple and multiple viral infections.⁴ Several attempts have been made at establishing the role of RV as a pathogenic agent in respiratory diseases or at determining whether RV could colonize nasal mucosa without inducing symptoms. It is to this effect that Nokso-Koivisto et al²³ conducted a study on 107 children, aged between 1 month and 16 years of age, all of whom were admitted to hospital for elective surgery. The purpose of the study was to examine the presence of picornavirus and coronavirus in the children's NPA. They found that 29% of the children produced virus-positive samples, of whom 80% suffered preceding or forthcoming respiratory symptoms.

Similarly, in a prospective birth cohort study conducted on children up to the age of 2, van Bente et al²⁴ found rhinovirus infection to be the most prevalent respiratory viral infection in infants (60%), even though in 20% of the infants who presented with no nasal symptoms, rhinovirus infections were also detected. It remains unclear whether these subclinical rhinovirus infections could also affect immune maturation in infants.

Rakes et al⁸ conducted an emergency-ward study on the NPA of children with asthma crises, aged between 2 and 16 years; the control for the study was a group of children who were being assessed for other pathologies. As previously described, they found RSV to be the most prevalent agent up to the age of 2 and rhinovirus most prevalent beyond this age. They described up to 40% rhinovirus presence among asymptomatic children, though the group had not been asked whether their upper tract infections had been contracted over the previous days or whether they had developed respiratory infections afterward, as did Nokso-Koivisto et al.²³ We did not perform a quantification of asymptomatic rhinovirus prevalence using a control group of children hospitalized with other pathologies.

In our series, 3.5% of the children infected by rhinovirus were diagnosed with pneumonia. In a study of the etiology of communal pneumonia in hospitalized Finnish children, Juven et al²⁵ isolated rhinovirus in as many as 24% of the children. Rhinovirus was second only to RSV. Approximately half the children with rhinovirus or RSV were also diagnosed as having a related bacterial infection, generally by *Streptococcus pneumoniae*, even though blood cultures came up negative, for all but one of the patients. The authors discuss whether the viral infection favors the bacterial infection, or whether both agents play a role in the development of pneumonia. Although only 3.5% of our children were diagnosed with pneumonia (as per our methodologic criteria), as many as 22% reflected radiologic infiltrations; the rest were diagnosed with bronchiolitis or recurrent wheezing with infiltrations. Our data were, therefore, similar to those reported by Juven et al.²⁵

The strength of our study lies in its prospective design, including all infants hospitalized for respiratory infection and

the wide range of viruses that are simultaneously screened. This range includes all viruses except of human bocavirus making it possible to determine the incidence and characteristics of multiple infections. The main weakness of the study is that it lacks a control group of asymptomatic children.

REFERENCES

1. Makela MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* 1998;36:539–542.
2. Arruda E, Pitkaranta A, Witek TJ, et al. Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2864–2868.
3. Blomqvist S, Roivainen M, Puhakka T, et al. Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. *J Med Virol.* 2002;66:263–268.
4. Andreoletti L, Lesay M, Deschildre A, et al. Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol.* 2000;61:341–346.
5. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson AG, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9–11 year old children. *Br Med J.* 1995;310:1225–1229.
6. Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, et al. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis.* 2003;187:1314–1318.
7. Turner RB. New considerations in the treatment and prevention of rhinovirus infections. *Pediatr Ann.* 2005;34:53–57.
8. Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, et al. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophil analyses. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:785–790.
9. Heymann PW, Harper HT, Murphy DD, et al. Viral infection in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:239–247.
10. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *Br Med J.* 1993;307:982–986.
11. Teichtahl H, Buckmaster N, Petrunkovs E. The incidence of respiratory tract infection in adults requiring hospitalization for asthma. *Chest.* 1997;112:591–596.
12. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1618–1623.
13. Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol.* 2003;69:132–144.
14. Corias MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol.* 2004;72:484–495.
15. López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, García-García ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods.* 2005;129:1–7.
16. McConnochie K. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child.* 1983;137:11–13.
17. Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M, Vrede WB, Pilon JW, Bruisten SM. Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5596–5603.
18. Billaud G, Peny S, Legay V, Lina B, Valette M. Detection of rhinovirus and enterovirus in upper respiratory tract samples using a multiplex nested PCR. *J Virol Methods.* 2003;108:223–228.
19. Papadopoulos NG, Moustki M, Tsolia M, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1285–1289.
20. Kotaniemi-Syrjänen A, Vainionpää R, Reijonen TM, Waris M, Korhonen K, Korppi M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy—the first sign of childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:66–71.
21. Lemanske RF, Jackson DJ, Gangnon RE, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:571–577.
22. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, et al. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1095–1101.
23. Nokso-Koivisto J, Kinnari TJ, Lindahl P, Hovi T, Pitkäranta A. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol.* 2002;66:417–420.
24. van Bente I, Koopman L, Niesters B, et al. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003;14:363–370.
25. Juven T, Metsola J, Waris M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:293–298.

**Role of rhinovirus in hospitalized infants with
respiratory tract infections in Spain.**

Calvo C, García-García ML, Blanco C, Frías ME, Casas I,
Pérez-Breña P.

Pediatr Infect Dis J 2007;26:904-8.

The Pediatric Infectious Disease Journal es la publicación oficial de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas Pediátricas de la Academia Americana de Pediatría y la revista de mayor prestigio en su campo.

Resumen del artículo

Los rinovirus son la causa más frecuente de infección respiratoria de vías altas tanto en adultos como en niños. Prácticamente todos los niños han sufrido una infección por rinovirus a los dos años. Sin embargo, debido a las dificultades para el aislamiento del rinovirus en cultivo celular, su papel en las infecciones respiratorias graves de los niños ha sido infraestimado hasta la implantación de las técnicas de diagnóstico molecular. El desarrollo de la PCR en los últimos años ha permitido ampliar el conocimiento acerca del rinovirus, del que hoy se sabe que es uno de los virus más importantes en las exacerbaciones asmáticas de adultos y niños. Sin embargo, aún existen pocos datos relativos al papel del rinovirus en las infecciones respiratorias de los niños menores de dos años. El objetivo de este estudio ha sido precisamente describir las características de las infecciones por rinovirus en los menores de 2 años ingresados por infección respiratoria en el Servicio de Pediatría del Hospital Severo Ochoa y compararlas con las de los niños con infección por VRS.

Pacientes y Métodos

Se incluyeron todos los niños menores de dos años ingresados por infección respiratoria desde septiembre de 2.003 a junio de 2.005, en el Servicio de Pediatría del Hospital Severo Ochoa. Los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes fueron recogidos prospectivamente mediante la cumplimentación de un cuestionario clínico diseñado al efecto, tal como se ha descrito en las publicaciones previas. Se recogió a todos los niños un aspirado nasofaríngeo, que fue enviado al Laboratorio de Gripe y Virus Respiratorios del Instituto Carlos III, para la detección, mediante dos ensayos de RT-nested PCR, de VRS A y B, influenza A, B y C, adenovirus, parainfluenza 1, 2, 3 y 4, rinovirus, coronavirus humano 229E y OC43, hMPV y HBoV.

Resultados

Se incluyeron 340 casos. En 244 (71,7%) de ellos se detectó al menos un virus respiratorio. Se identificó rinovirus en 85 muestras que correspondían a 85 episodios clínicos distintos de 81 niños, lo que supuso el 25% de todas las hospitalizaciones por infección respiratoria. En el 40% de los casos las detecciones de rinovirus se asociaron con uno o más virus respiratorios en el aspirado nasofaríngeo. El rinovirus fue el segundo virus más frecuente después del VRS.

Las infecciones por rinovirus tuvieron dos picos de máxima incidencia, el primero de ellos en primavera y el segundo a comienzos del otoño y se asociaron más frecuentemente con el diagnóstico de episodio recurrente de sibilancias.

No se encontraron diferencias significativas entre las infecciones sencillas por rinovirus y las coinfecciones de rinovirus con otros virus respiratorios. En cambio, sí hubo diferencias entre las infecciones sencillas por rinovirus y VRS. Los niños con infección por rinovirus fueron más frecuentemente varones ($p=0,004$), presentaron bronquiolitis y precisaron

oxigenoterapia con menor frecuencia que los niños infectados por VRS ($p < 0,001$ y $p < 0,001$).

Conclusiones

Nuestros resultados muestran que el rinovirus es el segundo virus más frecuente en las infecciones respiratorias graves de los niños menores de 2 años que requieren ingreso. Las manifestaciones clínicas asociadas con este virus son similares a las del VRS, siendo los diagnósticos más frecuentes episodios recurrentes de sibilancias y bronquiolitis. Las coinfecciones no parecen conferir mayor gravedad al cuadro clínico.

V.- DISCUSIÓN INTEGRADORA

Las infecciones respiratorias virales continúan siendo una de las causas principales de morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas. Aunque frecuentemente son autolimitadas, en determinados grupos de riesgo como los niños, los ancianos y los inmunodeprimidos, pueden asociarse con cuadros clínicos graves e incluso a veces, mortales. Está claramente establecido que la mayoría de las infecciones respiratorias de vías aéreas inferiores están causadas por un virus, sin embargo hasta en un tercio de los casos no se consigue demostrar ningún agente etiológico. En los últimos 10 años los avances en la Biología Molecular y la posibilidad de amplificar los genomas virales de una forma no dependiente de la secuencia, han permitido el descubrimiento de algunos virus respiratorios humanos no identificados hasta ahora, que posiblemente quedaban incluidos en ese porcentaje de infecciones no diagnosticadas previamente. Nuestros estudios, junto a otros publicados en la literatura internacional, proporcionan datos relevantes que parecen sugerir que estos nuevos patógenos son responsables de una proporción importante de las infecciones respiratorias graves, especialmente en los niños.

1. METAPNEUMOVIRUS HUMANO

Este estudio, en el que se han incluido más de 1.300 niños, con 101 casos de infección por hMPV, describe una de las series más numerosas publicadas hasta ahora y proporciona una estimación bastante aproximada de la importancia real de hMPV en las infecciones respiratorias graves de los niños, según el estado del conocimiento actual. A lo largo de las 5 temporadas consecutivas en las que se ha llevado a cabo el estudio, las infecciones por hMPV han supuesto el 7,5% de todas las infecciones respiratorias y el 11% de las infecciones con algún aislamiento viral. En relación con otros virus respiratorios clásicos, hMPV ha resultado ser el tercero más frecuente, tras VRS y rinovirus, situándose por delante de adenovirus, influenza o parainfluenza. Sin embargo, es necesario tener presente por un lado, que en este estudio no estaba incluido HBoV, descrito

posteriormente y que como se comentará tiene una enorme importancia en las infecciones respiratorias pediátricas y por otro, que se ha estudiado la presencia de rinovirus sólo en las últimas dos temporadas.

Desde la detección de hMPV en 2.001 en Holanda por el grupo de Osterhaus, se han publicado varias series de pacientes con infección por hMPV, con cifras muy variables en cuanto a su prevalencia en las infecciones respiratorias de los niños. No es de extrañar esta variabilidad en los resultados, dada la heterogeneidad en la metodología empleada por los distintos autores. Por un lado, aunque la mayoría de las series incluyen niños hospitalizados por infección respiratoria, en algunas se estudia la presencia de hMPV en las muestras respiratorias de todos los niños ingresados^{98,134,135,136,137,138}, mientras que en otras sólo se investigan las muestras negativas para otros virus respiratorios^{100,139,140,141}. Dado que hMPV coinfecta frecuentemente con otros virus, es fácil entender que la incidencia de hMPV puede infraestimarse si sólo se estudia su presencia en las muestras negativas, como ha ocurrido en la serie argentina (4,4%) o francesa (6,6%). En cambio, los estudios de Cuevas et al¹³⁵ y Døllner et al, estudiando tanto las muestras positivas como las negativas, encontraron hMPV en el 17% y 21% respectivamente de los niños con una infección respiratoria aguda, lo que habla a favor de su importante papel en este contexto.

Otro posible factor confusor a la hora de evaluar la frecuencia real de hMPV es la distinta edad de los pacientes incluidos en los estudios. Aunque hMPV puede afectar a personas de todas las edades, su incidencia es máxima en los niños más pequeños, especialmente en los menores de un año, como demuestran también nuestros resultados. Por ello, los estudios que incluyen sólo niños menores de 2-3 años, encuentran hMPV en porcentajes muy superiores (17-25%)^{98,135,142} a los que incluyen niños mayores y adultos (1,5%-5,5%)^{99,137,141,143,144}.

Por último, la circulación estacional de hMPV también puede contribuir a que se obtengan resultados muy diferentes dependiendo de si se estudian

temporadas epidemiológicas completas o no. De cualquier manera y a la luz de los estudios de seroprevalencia publicados, es probable que hMPV sea un virus ubicuo, mucho más frecuente de lo que se pensaba en un principio. El estudio inicial de van den Hoogen et al investigó la seroprevalencia de hMPV en 400 personas de distintas edades, encontrando que el 25% de los niños de entre 6 y 12 meses tienen anticuerpos frente a este virus y que a la edad de 5 años prácticamente todos los niños son ya seropositivos. Resultados similares se han publicado en Japón¹⁴⁵ e Israel¹⁴⁶. Estos datos apuntan a que hMPV es probablemente un virus muy frecuente en las infecciones respiratorias virales adquiridas en la comunidad en todas las edades, aunque la repercusión clínica, y por tanto, la necesidad de hospitalización es considerablemente mayor en los grupos de menor edad.

El comportamiento estacional de hMPV parece ser cada vez más evidente. En nuestro estudio, el pico de máxima incidencia se registró en todas las temporadas, desde febrero a mayo, inmediatamente después de la epidemia invernal de VRS. Durante los meses de noviembre a enero coincidieron ambos virus, aunque con una incidencia de hMPV mucho menor. Estos datos explican los diferentes resultados encontrados en aquellos estudios que han incluido pacientes únicamente en los meses de máxima incidencia de otros virus respiratorios, especialmente de VRS, con respecto a los que han optado por un periodo de reclutamiento más amplio. Como ejemplo, en las series francesa y noruega, en las que no se incluyeron años completos, fueron los meses de noviembre y diciembre los de máxima actividad de hMPV. En cambio, otras series que sí han estudiado el comportamiento de hMPV a lo largo de todo el año, coinciden con nuestros resultados, observando el mayor número de infecciones por hMPV en la primavera y últimos meses del invierno^{142,147,148}. Curiosamente la actividad de hMPV, que fue homogénea a lo largo de 4 de las 5 temporadas estudiadas, aumentó significativamente en la temporada 2.001/02, registrándose el mayor número de infecciones por este virus.

La mayoría de las características clínicas de nuestros pacientes están en consonancia con lo descrito en la literatura. Claramente la infección por

hMPV tiene mayor repercusión clínica en los niños pequeños y en especial en los menores de dos años^{97,98,134}. De hecho, la mayoría de las series publicadas en pacientes hospitalizados, son fundamentalmente series pediátricas y en aquellas que incluyen niños y adultos, la mayor proporción de infectados se registra invariablemente en los pacientes de menor edad^{99,143}. Nuestros resultados apoyan estos datos, ya que aunque todos nuestros casos eran lactantes con menos de 2 años de edad, el 80% de los infectados por hMPV eran menores de 12 meses.

La afectación clínica de los niños con infección por hMPV incluidos en nuestra serie fue significativa como lo demuestra, además de la indicación de hospitalización, la necesidad de oxigenoterapia en la mitad de los casos. La mayoría de los pacientes presentó una infección respiratoria de vías aéreas inferiores, siendo los diagnósticos más frecuentes la bronquiolitis con o sin infiltrado/atelectasia pulmonar (56,6%) y el episodio recurrente de sibilancias (36,6%). Varios estudios han mostrado que hMPV es una de las causas más frecuentes de bronquiolitis en lactantes. Además, aunque un estudio llevado a cabo por Rawlinson et al¹⁴⁹ puso en tela de juicio el papel de hMPV en las reagudizaciones asmáticas, otros autores han coincidido con nuestros resultados, demostrando que hMPV se asocia con frecuencia con episodios de sibilancias o exacerbaciones de asma^{99,147,150}. Muy recientemente se han publicado en Finlandia los resultados de un estudio de seguimiento de niños menores de 13 años a lo largo de una temporada epidemiológica. El 10% de los infectados por hMPV presentó sibilancias como manifestación clínica asociada¹⁵¹.

En definitiva, no parece que las manifestaciones clínicas asociadas a infección por hMPV sean específicas de este virus. Por el contrario, son muy similares a las asociadas a la infección por VRS¹⁵². De hecho, en nuestro estudio la comparación de las infecciones sencillas por hMPV con las infecciones sencillas por VRS, mostró que las características clínicas de ambas entidades son muy similares. Únicamente se observaron pequeñas diferencias en cuanto a la edad de los pacientes y la frecuencia de

bronquiolitis vs sibilancias recurrentes, pero el resto de las variables estudiadas fueron absolutamente indistinguibles.

Las enfermedades crónicas subyacentes y la prematuridad parecen conferir mayor riesgo de presentar infecciones graves por hMPV. En nuestro estudio el 8% de los niños con infección por hMPV sufrían alguna enfermedad crónica, pero en algunas series hasta el 30% de los niños hospitalizados con una infección por hMPV presentan alguna patología de base^{97,140}. Por otro lado, aunque no se han investigado suficientemente los factores de riesgo para infección grave por hMPV, algunos estudios como el de Semple et al¹⁵³, sugerían que las coinfecciones de hMPV con VRS se asociaban con bronquiolitis más grave, al detectar coinfección de ambos virus en el 70% de las bronquiolitis que precisaron ingreso en una unidad de cuidados intensivos. Otros estudios llevados a cabo por Greensill et al¹⁵⁴, König et al¹⁵⁵ también apuntaban a una mayor gravedad de las coinfecciones en relación con las infecciones sencillas. Sin embargo, esta posible asociación sinérgica entre ambos virus no se ha podido demostrar en otros estudios^{136,140,142}. En nuestra serie, con una elevada tasa de coinfecciones (29,7%), no se encontraron diferencias en parámetros directa o indirectamente relacionados con la gravedad, como duración de la estancia hospitalaria, necesidad de oxigenoterapia, prescripción de antibioterapia, frecuencia de alteraciones radiológicas significativas (atelectasia/infiltrado) o diagnóstico clínico entre las infecciones simples por hMPV y las coinfecciones. Estos resultados sugieren que la presencia de hMPV en el contexto de otra infección viral respiratoria no confiere mayor gravedad al cuadro clínico. Sin embargo, esta conclusión no es extrapolable a las formas más graves de enfermedad, ya que sólo un paciente en nuestra serie requirió ventilación mecánica.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que hMPV ha circulado en España y que es un patógeno respiratorio común especialmente en lactantes y niños hospitalizados por infección respiratoria. Este nuevo virus se asocia con infecciones respiratorias de vías altas y bajas y puede ser un desencadenante de crisis asmáticas. El cuadro clínico es muy similar

al producido por VRS y las coinfecciones con otros virus respiratorios, aunque frecuentes, no parecen conferir mayor gravedad al cuadro clínico. Los siguientes desafíos a los que habrán de hacer frente futuras investigaciones, deberían estar dirigidos a profundizar en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad asociada a hMPV y al desarrollo de vacunas seguras y eficaces para proteger de la infección a personas de riesgo, en nuestro caso, a los niños.

2. BOCAVIRUS HUMANO

Los resultados de nuestro estudio, en el que se ha investigado la presencia de HBoV y de otros 15 virus respiratorios en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda, muestran una de las incidencias más elevadas de infección por HBoV publicadas hasta ahora, siendo aproximadamente 5 veces mayor que la referida en el estudio sueco original. Según nuestros datos, HBoV ha circulado en España con una incidencia de casi 17% en la población pediátrica hospitalizada por infección respiratoria, siendo el segundo virus más frecuente tras el VRS. Esta es una de las frecuencias más elevadas descritas hasta ahora y puede suponer una aproximación bastante real a la incidencia relativa de este virus, ya que en nuestro estudio se ha investigado la presencia de todos los virus respiratorios descritos hasta el momento, excepto los nuevos coronavirus HCoV-NL63 y HCoV- HKU1.

El bocavirus humano (HBoV) fue descrito por primera vez en septiembre de 2.005 por Tomas Allander en el Hospital Universitario Karolinska en Suecia. El hallazgo fue el resultado de una investigación intensiva en dos grupos de aspirados nasofaríngeos recogidos en periodos cronológicos distintos. La mayoría de las muestras correspondían a pacientes pediátricos con infecciones respiratorias agudas. En la serie original se identificó HBoV en 17(3,1%) de 540 muestras, con una tasa de coinfección de 17,6%, aunque no se estudió la presencia de rinovirus. Desde la descripción inicial se ha comunicado la circulación de este nuevo virus en Australia, Asia, Europa, América, y África^{90,156,157,158,159,160,161,162,163,164}, con unas cifras de incidencia muy variables que oscilan entre el 1,5 y el 19%^{161,165}. De nuevo, la distinta metodología y los diferentes criterios de selección de los casos hacen que los resultados de las distintas series sean difícilmente comparables. Así, mientras en la serie canadiense de Bastien et al¹⁶¹ en la que se detectó HBoV en el 1,5% de las muestras, se incluyeron pacientes hospitalizados y ambulatorios de todas las edades, en el estudio de Allander et al¹⁶⁵, llevado a cabo en Finlandia, se incluyeron únicamente niños hospitalizados por un episodio de sibilancias, con edades

comprendidas entre 3 meses y 15 años, detectándose HBoV en el 19% de los casos. Por otro lado, algunos estudios han investigado la frecuencia de HBoV en todas las muestras respiratorias remitidas al laboratorio^{9,161}, mientras que otros han limitado la investigación a las muestras procedentes de pacientes con enfermedad respiratoria documentada o a los menores de 5 años. El estudio japonés incluyó únicamente las muestras procedentes de niños con infección respiratoria de vías aéreas inferiores, en las que previamente se había excluido la presencia de otros virus respiratorios (VRS A, B, influenza y hMPV). Por tanto, es difícil establecer comparaciones en cuanto a la incidencia de HBoV en los diferentes países o continentes, dada la heterogeneidad empleada en los estudios. En cualquier caso, lo que sí parece evidente es que HBoV constituye uno de los virus más frecuentes en la población pediátrica hospitalizada por una infección respiratoria aguda.

La elevada frecuencia de infección por HBoV observada en nuestro estudio, coincide con la de algunos autores como Allander et al¹⁶⁵ (19%), Choi et al¹⁶⁶ (11,3%), Kaplan et al (18%), Kleines et al¹⁶⁷ (12,8%) o Weissbrich et al (10,3%). La sensibilidad de la nested-PCR desarrollada por nuestro grupo permite detectar al menos 10 copias del genoma de HBoV. Una sensibilidad comparable ha sido comunicada, mediante la utilización de protocolos de PCR en tiempo real, por otros autores como Allander et al que encontraron HBoV en el 19% de los niños hospitalizados por sibilancias, siendo ésta la mayor incidencia de HBoV publicada hasta ahora. Curiosamente Kleines et al, empleando PCR en tiempo real, que permite cuantificar la carga viral, concluyeron que la carga viral de HBoV es relativamente baja independientemente de la severidad del cuadro clínico o de la edad del paciente. Estos datos subrayan la importancia de utilizar ensayos sensibles de PCR para garantizar la detección de HBoV. La excelente sensibilidad de la nested-PCR empleada en nuestro estudio, ha permitido lograr tasas de detección de HBoV tan elevadas como las conseguidas con protocolos de PCR en tiempo real.

Una característica diferencial de HBoV es la frecuencia con que coinfecta con otros virus respiratorios. En la serie australiana, se detectó coinfección de HBoV con otros patógenos respiratorios en el 56% de los casos. En el estudio jordano la frecuencia de infecciones mixtas fue de 72%. En nuestro estudio la prevalencia de coinfecciones fue también muy elevada, 65%, siendo especialmente frecuentes las infecciones mixtas con VRS, adenovirus y rinovirus. Es probable que la tasa de coinfección sea incluso mayor, ya que en ninguno de los estudios descritos se ha investigado la presencia de los coronavirus NL63 y HKU1. En otras series la frecuencia de coinfección, aunque también elevada, es considerablemente inferior a la descrita por nuestro grupo, probablemente debido a la diferente metodología empleada. En las series japonesa y americana la presencia de HBoV se investigó solo en las muestras negativas para otros virus respiratorios^{156,163}. En los estudios llevados a cabo en Sudáfrica, Alemania y Francia, la frecuencia de coinfecciones de HBoV con otros virus respiratorios fue de 37%, 50%, y 34% respectivamente. En estos tres estudios se empleó inmunofluorescencia en lugar de la PCR, técnica mucho más sensible empleada por nuestro grupo y por el grupo jordano. Además, en el estudio alemán no se evaluó la presencia de hMPV y el rinovirus no fue incluido en ninguno de los tres.

Nuestros resultados, con respecto a la distribución estacional de las infecciones por HBoV, coinciden con los de la mayoría de las publicaciones procedentes de países con clima templado: las infecciones por HBoV, aunque ocurren a lo largo de todo el año, son especialmente frecuentes durante los meses de invierno y primavera. Sin embargo hay que tener presente que el número de temporadas estudiado es aún limitado y que muchos estudios tienen un diseño retrospectivo y cuentan con la limitación de haber incluido pacientes únicamente durante los meses de invierno, coincidiendo con la epidemia de la mayoría de los virus respiratorios. Por ello, es arriesgada la obtención de conclusiones definitivas acerca del comportamiento estacional de HBoV.

Hasta ahora se han publicado pocos estudios que incluyan adultos, pero los datos disponibles parecen indicar una menor prevalencia de las infecciones por HBoV en este grupo de edad^{9,160,161}. En el estudio seroepidemiológico publicado en Japón por Endo et al¹⁶⁸, se ha demostrado que el 71% de la población de 0 a 41 años tiene anticuerpos circulantes frente a HBoV. La seroprevalencia es mínima entre los 6 y 8 meses de edad y aumenta progresivamente hasta alcanzar el 94% en los mayores de 6 años. La existencia de una prevalencia de anticuerpos tan elevada, frente a la escasa frecuencia del virus entre los sujetos mayores de 6 años, sugiere que debe existir una cierta inmunidad protectora tras la primoinfección.

La mayoría de las series publicadas demuestran que la infección sintomática por HBoV es más frecuente en niños. En nuestro estudio, que incluyó pacientes de 0 a 14 años, el 75% era menor de dos años, lo que demuestra que al menos en lo que respecta a las infecciones graves, HBoV es mucho más frecuente en los niños más pequeños.

La mayoría de los datos disponibles en la literatura acerca de las manifestaciones clínicas asociadas con la infección por HBoV se han obtenido en estudios retrospectivos, lo que limita en parte la calidad y fiabilidad de los mismos. Los síntomas descritos con mayor frecuencia han sido tos, rinorrea y fiebre elevada y los diagnósticos más habituales, bronquiolitis, neumonía y exacerbación asmática^{142,165,169}. Nuestro estudio forma parte de una línea de investigación de las infecciones respiratorias graves en el niño y cuenta con una metodología prospectiva en la recogida de los datos clínicos. En la historia clínica de todos los pacientes hospitalizados por una infección respiratoria se incluye, al ingreso, un cuestionario específicamente diseñado para el estudio, donde se van recogiendo los datos clínicos a medida que van ocurriendo. La validez de nuestros datos esté avalada por esta metodología. El 91% de los niños con infección por HBoV en nuestra serie presentaron una infección de vías aéreas inferiores. Los diagnósticos más frecuentes fueron crisis asmática o episodio recurrente de sibilancias (51%) y bronquiolitis (30,5%). Estos resultados subrayan la importancia de HBoV como posible desencadenante

de exacerbaciones asmáticas graves. En la misma dirección apuntan los resultados obtenidos por Allander et al, que detectó HBoV en el 19% de los niños hospitalizados por un episodio de sibilancias, siendo el tercer virus más frecuente en estos pacientes. Por otro lado, el 10% de los niños con infección por HBoV ingresaron con el diagnóstico de neumonía, sin broncoespasmo u otros datos de infección vírica acompañantes. La afectación clínica fue significativa, como lo demuestra que más de la mitad de los pacientes precisara oxigenoterapia y que la estancia hospitalaria fuera relativamente prolongada. La fiebre elevada fue muy frecuente (71%), lo que unido a la leucocitosis y elevación de la proteína C reactiva asociadas, explica que el 30% de los niños recibiera antibioterapia ante la sospecha de infección bacteriana.

Aunque los síntomas respiratorios fueron la manifestación más comúnmente asociada a infección por HBoV, algunos pacientes presentaron síntomas extrapulmonares. En tres niños se objetivó un exantema cutáneo petequial, que en dos casos estuvo acompañado de hipotensión, afectación del estado general e hipoperfusión, por lo que fueron diagnosticados de sospecha de sepsis, ingresando uno de ellos en la Unidad de Cuidados Intensivos. El único agente identificado fue HBoV en el aspirado nasofaríngeo, siendo negativos todos los cultivos bacterianos. Otros autores han descrito la asociación de exantema con infección por HBoV, aunque con un cuadro clínico más leve que el descrito en nuestros pacientes^{170,171}. Una niña con anemia drepanocítica, presentó una crisis vasooclusiva con fiebre elevada y mínima rinorrea, por lo que se recogió un aspirado nasofaríngeo, detectándose HBoV como infección sencilla. Por último, también se detectó HBoV en la muestra respiratoria de un niño con meningitis linfocitaria y fiebre elevada.

Nuestros datos pusieron de manifiesto por primera vez, la presencia de HBoV en las heces y en la orina de dos pacientes con síntomas respiratorios, pero asintomáticos desde el punto de vista digestivo. Este hallazgo puede reflejar simplemente la excreción del virus por vía digestiva o urinaria, aunque también podría apoyar la posibilidad de que HBoV se

asocie con manifestaciones sistémicas extrapulmonares. Muy recientemente otro grupo español ha comunicado el hallazgo de HBoV en las heces de niños con gastroenteritis, abundando en esta última hipótesis¹⁷².

Curiosamente 7 pacientes precisaron hospitalización en más de una ocasión por infecciones respiratorias que clínicamente eran procesos distintos. En todos ellos se detectó HBoV en dos o más episodios. El análisis filogenético de los virus detectados permitió confirmar la cocirculación de los dos cluster de HBoV descritos hasta ahora. En 6 de estos 7 niños se identificó el cluster Sweden ST1-like. Sólo en un caso el análisis de las secuencias mostró el cluster Sweden ST2-like en ambas muestras. A la luz de estos resultados, cabe la posibilidad de que estas detecciones repetidas en el tiempo de HBoV en el mismo paciente, se traten de reinfecciones por el mismo cluster, o bien que el periodo de excreción del virus sea tan prolongado que siga detectándose meses después de la primera infección. No existe hasta el momento ningún estudio que evalúe la duración de la excreción viral de HBoV, por lo que no es posible resolver esta interrogante. Nuestro grupo ya ha puesto en marcha un estudio con el objetivo de determinar la duración de la excreción de HBoV en las secreciones nasofaríngeas tras un episodio agudo de infección respiratoria.

El hecho de que HBoV sea un virus prevalente en las muestras respiratorias de pacientes con infecciones respiratorias agudas, no demuestra que tenga un papel causal de los síntomas. De hecho, hasta el momento actual, la evidencia de una asociación causal entre HBoV y enfermedad respiratoria es incompleta. La frecuencia inusualmente elevada de infecciones en las que HBoV coinfecta con otros virus respiratorios, hace complicado establecer la asociación causal entre HBoV y enfermedad. En nuestro estudio las infecciones sencillas por HBoV se asociaron con manifestaciones y repercusión clínicas totalmente superponibles a las coinfecciones de HBoV con otros virus respiratorios, lo que apoya el papel patogénico de HBoV por sí mismo.

Profundizando en este tema, nuestro grupo se propuso realizar un estudio pormenorizado de las infecciones sencillas por HBoV, con el doble objetivo de aportar nuevos datos que pudieran ayudar a dilucidar si las infecciones sencillas por HBoV se asocian con afectación clínica significativa y de evaluar si ésta es distinta de la asociada con las infecciones sencillas por los virus respiratorios clásicos: VRS, adenovirus y rinovirus. Se identificaron HBoV en 99 casos, 35 como infección sencilla y 64 como infección múltiple (64,6%). Nuestros resultados indican la existencia de una asociación entre infección única por HBoV y afectación clínica significativa, ya que todos los niños con infección sencilla por HBoV presentaron síntomas de vías aéreas inferiores, confirmando a la crisis asmática/episodio de sibilancias como el diagnóstico más frecuente, seguido de bronquiolitis. Además, las infecciones por HBoV presentaron algunas características diferenciales cuando se les comparó con otros virus respiratorios. Con respecto a las infecciones por VRS, las infecciones por HBoV se asociaron con más frecuencia con asma que con bronquiolitis ($p < 0,001$), afectaron a niños de mayor edad ($p: 0,017$) y presentaron mayores niveles de Proteína C reactiva ($p: 0,003$). En relación con las infecciones por adenovirus, las infecciones por HBoV se asociaron con más frecuencia con bronquiolitis ($p: 0,017$), mientras que los niños infectados con adenovirus presentaron fiebre más elevada ($p: 0,036$) y mayores cifras de leucocitos en sangre periférica ($p: 0,042$), lo que posiblemente motivó que recibieran con mayor frecuencia antibioterapia ($p: 0,009$). En cambio, las infecciones por HBoV fueron muy similares a las asociadas con rinovirus, ya que ambos afectaron a niños de edades muy similares, siendo la crisis asmática el diagnóstico más frecuente en ambos casos. Curiosamente la afectación clínica, reflejada por el porcentaje de niños que precisaron oxigenoterapia, fue más grave en el caso de la infección por HBoV.

Estos resultados aportan nuevas evidencias del papel causal de HBoV en las infecciones respiratorias pediátricas, ya que las infecciones por HBoV como agente único no sólo se asociaron con síntomas suficientemente graves como para requerir ingreso hospitalario, sino que además

presentaron ciertas características peculiares que le diferencian en algunos aspectos de los virus respiratorios clásicos.

A pesar de que uno de los puntos más importantes a la hora de evaluar el papel patogénico de un virus es la frecuencia con la que es detectado en sujetos sanos, muy pocos grupos han evaluado este tema. Kesebir et al investigaron la presencia de HBoV en 96 muestras respiratorias procedentes de niños sanos, recogidas a lo largo de seis meses, no detectando HBoV en ninguna de ellas. Resultados muy similares fueron los obtenidos por Allander et al Fry et al¹⁷³ y Maggi et al. Estos resultados apoyaban la hipótesis que atribuía un papel etiológico a HBoV. Sin embargo Longtin et al¹⁷⁴ en un estudio muy reciente han publicado unos resultados, cuanto menos sorprendentes, al detectar HBoV con mayor frecuencia en niños asintomáticos (43%) que en niños con infección respiratoria (13.8%). Estos autores basan la espectacular diferencia de sus resultados, en la distinta metodología de recogida de las muestras respiratorias: frotis nasal vs aspirado nasofaríngeo. Sin embargo, en nuestra opinión, la mayor diferencia radica sin duda en el tipo de grupo control elegido por Longtin et al, compuesto fundamentalmente por niños que ingresaron para someterse a cirugía otorrinolaringológica, fundamentalmente adenoidectomía y amigdalectomía. Esto supone un sesgo de selección considerable ya que se ha considerado grupo control asintomático a unos niños con patología respiratoria recurrente de vías altas, de la suficiente intensidad como para requerir cirugía a ese nivel. La validez de sus resultados queda, por tanto, muy comprometida. Con el objetivo de aumentar nuestro conocimiento en este tema, nuestro grupo estudió la frecuencia de detección de HBoV en niños sanos a lo largo de un año y la comparó con la observada en niños ingresados por procesos respiratorios. Se detectó HBoV en el 5% (6/116) de los niños asintomáticos frente al 17% de los niños con síntomas respiratorios ($p < 0,001$). Este estudio demuestra que, aunque HBoV puede estar presente en la nasofaringe de los niños sanos, su frecuencia es significativamente inferior a la de los niños con infecciones respiratorias. Otros virus respiratorios con un papel patogénico claramente establecido, como

rinovirus y adenovirus, fueron también detectados en el 12% y 6,7% respectivamente de los niños sanos.

En resumen, nuestros resultados muestran que las infecciones por HBoV son muy prevalentes en los niños hospitalizados por procesos respiratorios agudos, que las coinfecciones son muy frecuentes aunque prácticamente indistinguibles desde el punto de vista clínico de las infecciones sencillas y que la frecuencia de detección de HBoV en niños sanos es significativamente inferior a la de los niños con síntomas respiratorios. Todos estos datos apoyan el papel patogénico de HBoV como agente respiratorio, pero hay que tener en cuenta que aún no se ha conseguido ni un método para el cultivo del virus, ni un modelo de infección animal y que establecer el papel causal de un agente específico en una enfermedad es un proceso muy complicado, que requiere múltiples estudios¹⁷⁵. Esta afirmación es aplicable a la mayoría de los virus recientemente identificados, que han permanecido sin detectar por su incapacidad para replicarse in vitro bajo condiciones estándar, lo que impide cumplir los postulados de causalidad de Koch.

3. RINOVIRUS

Nuestro estudio, en el que se ha investigado de forma sistemática la incidencia de las infecciones por rinovirus mediante el empleo de PCR, ha mostrado que el rinovirus es el segundo agente más frecuente en las infecciones respiratorias graves de los niños menores de dos años. En nuestra serie, el 25% de los lactantes hospitalizados por una infección respiratoria aguda presentó rinovirus en su aspirado nasofaríngeo, siendo solo superado por el VRS. En este estudio no se incluyó bocavirus.

El papel del rinovirus en las infecciones respiratorias de los niños ha sido infraestimado porque hasta hace sólo unos años los métodos diagnósticos clásicos para la detección de VRS y de otros virus respiratorios, eran poco sensibles para el diagnóstico de rinovirus. Además, los rinovirus se asociaron tras su descripción inicial, con infecciones respiratorias leves como el catarro común y fueron considerados virus con poco significado clínico. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de diagnóstico molecular, que permiten la detección del genoma viral, ha ampliado el espectro de las manifestaciones clínicas conocidas del rinovirus, mostrando que es uno de los agentes más frecuentes en las infecciones respiratorias de vías aéreas inferiores de los niños^{111,112}. De hecho, en la actualidad está empezando a ser considerado como uno de los desencadenantes más importantes de los episodios de sibilancias y se le relaciona con el incremento de crisis asmáticas que ocurre todos los otoños en niños en edad escolar^{147,176}. Johnston et al¹⁷⁷ comunicaron, en un estudio ya clásico, que entre el 80 y el 85% de los niños de 9 a 11 años que consultan por una crisis asmática, presentan una infección respiratoria viral, suponiendo los picornavirus (rinovirus y enterovirus) el 66% de ellas. Sin embargo, el papel del rinovirus en las infecciones respiratorias graves de los lactantes y niños pequeños es aún poco conocido y existen pocas publicaciones que hayan abordado este tema. Nuestros resultados muestran que es un virus muy prevalente en las infecciones respiratorias de las vías aéreas inferiores de los lactantes, ya que fue el segundo en frecuencia, muy por delante de adenovirus, virus influenza o metapneumovirus humano. Desde el punto de vista de las

manifestaciones clínicas, observamos que prácticamente la mitad de los niños menores de 2 años infectados por rinovirus fueron diagnosticados de episodio recurrente de sibilancias y el 36% de bronquiolitis. Estos datos sugieren que el rinovirus es uno de los desencadenantes más importantes de sibilancias, no sólo en niños mayores y adultos, sino también en lactantes. Con respecto a la bronquiolitis, otra de las manifestaciones clínicas más frecuentemente asociadas con la infección por rinovirus en nuestra serie, ha sido descrita también en algunas publicaciones. Papadopoulos et al¹¹¹ encontraron rinovirus como agente único en 12 (10%) de 119 niños menores de un año con bronquiolitis. Jacques et al¹⁷⁸ detectaron rinovirus en el 21% de los niños menores de 3 años diagnosticados de bronquiolitis, aunque sólo en dos (2%) como agente único. También se ha identificado rinovirus en niños hospitalizados por neumonía. En un estudio prospectivo llevado a cabo en niños finlandeses, Juven et al¹⁷⁹ identificaron rinovirus en el 25% de los casos, siendo el segundo en frecuencia tras el VRS. En nuestra serie se diagnosticó neumonía, según los criterios previamente establecidos de consolidación y/o atelectasia, en el 3,5% de los niños infectados por rinovirus. Sin embargo, otro 22% de nuestros pacientes presentaron también alteraciones radiológicas compatibles con infiltrado pulmonar, aunque en el contexto de bronquiolitis o de episodio recurrente de sibilancias, por lo que no fueron incluidos inicialmente en el grupo de niños con neumonía. Por tanto, parece evidente que el rinovirus se asocia con entidades clínicas de indudable repercusión clínica, como asma, bronquiolitis y neumonía, no sólo en los niños mayores y adultos, sino también en lactantes.

Una de las principales dificultades que se plantea a la hora de asociar etiológicamente al rinovirus con un cuadro clínico determinado, es la elevada frecuencia con la que coinfecta con otros virus respiratorios y la alta tasa de detección del virus en sujetos sanos. En 34 (40%) de nuestros pacientes infectados por rinovirus se detectó simultáneamente al menos otro virus respiratorio, sobre todo VRS y adenovirus. Tasas de coinfección similares o incluso mayores a la nuestra han sido descritas por otros autores^{111,180} y han

aumentado considerablemente en los últimos años, gracias a la investigación sistemática de las muestras respiratorias mediante ensayos de PCR múltiple, que permiten detectar en la misma reacción la mayoría de los virus respiratorios conocidos. Sin embargo, no está completamente aclarado cual es el papel que juegan los virus detectados simultáneamente en un mismo paciente. Podrían representar infecciones concurrentes, infecciones secuenciales o simplemente, un estado de portador asintomático de uno o más agentes virales. Se desconoce si un virus es capaz de facilitar o antagonizar la infección simultánea de otro virus en el mismo huésped. Nuestro grupo, en un intento de dar respuesta al interrogante del posible papel etiológico de los rinovirus, comparó las características clínicas de los niños con infección sencilla por rinovirus y las de aquéllos con infecciones dobles o múltiples. No se encontró ninguna diferencia significativa entre ambos grupos (excepto mayor frecuencia de género masculino en las infecciones sencillas), incluyendo indicadores indirectos de gravedad como porcentaje de pacientes con oxigenoterapia, proporción de infiltrado/atelectasia en los estudios radiológicos o duración de la hospitalización. Estos resultados sugieren que la infección por rinovirus como agente único se asocia con idéntica afectación clínica que las coinfecciones y apoyan el papel patogénico del rinovirus en las infecciones respiratorias graves de los niños. A diferencia de lo descrito por otros autores, nuestro grupo no observó mayor gravedad en las infecciones múltiples con respecto a las simples.

Con respecto a la detección del rinovirus en sujetos sanos, los autores que han estudiado la prevalencia de rinovirus en niños sin patología respiratoria, han descrito porcentajes de positividad en torno al 20%^{181,182}. En un estudio llevado a cabo por Rakes et al¹⁸³ se identificó rinovirus en el 40% de un grupo control. Sin embargo la inadecuada metodología empleada en este último estudio, en el que no se investigó la aparición de síntomas respiratorios en los días posteriores a la recogida de la muestra, hace difícilmente asumibles los resultados. Nuestro grupo encontró rinovirus en el 10% de los niños que no sólo estaban asintomáticos en el momento de la

recogida de la muestra respiratoria, sino también en los 10 días previos y en los 10 posteriores a la misma. Esta prevalencia de rinovirus en niños sanos es significativamente menor al 25% observado en nuestro estudio en niños hospitalizados por infección respiratoria. Nuestros datos, que concuerdan con los obtenidos por Johnston et al¹⁸⁴ y Nokso-Koivisto et al (12 y 13% de rinovirus en controles asintomáticos respectivamente), de nuevo muestran una clara asociación entre infección por rinovirus y enfermedad respiratoria, aunque la frecuencia de rinovirus en la población general hace difícil cuantificar la importancia de rinovirus en estos procesos.

En conclusión, la evidencia disponible en la actualidad apoya la idea de que los rinovirus están implicados en las infecciones de las vías aéreas inferiores de los niños, especialmente en las exacerbaciones asmáticas, en las bronquiolitis y en las neumonías. Son necesarias nuevas líneas de investigación que aclaren cual es el papel del rinovirus en las infecciones múltiples, si el daño en las vías aéreas está producido por el virus en sí mismo o si es secundario a la respuesta inmune desencadenada tras la infección y cuáles son las características específicas del huésped que favorecen la infección por rinovirus. Las respuestas a estas cuestiones probablemente serán de gran ayuda a la hora de valorar la utilidad de diseñar estrategias terapéuticas específicas frente a este virus.

4. RELACIÓN VIRUS Y ASMA

El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuente en la infancia, ya que afecta a más de 155 millones de personas en todo el mundo¹⁸⁵. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que en la mayoría de los casos, los síntomas de asma aparecen en los primeros años de la vida y que las alteraciones en la función pulmonar de los adultos con asma, están ya presentes en la primera década y en especial, en los primeros 3 años.

La asociación epidemiológica entre bronquiolitis vírica en la infancia y desarrollo posterior de sibilancias recurrentes y/o asma ha sido motivo de estudio y polémica desde hace décadas^{22,186}. La diferente metodología empleada en los estudios que han evaluado esta asociación, ha dificultado la obtención de conclusiones que inequívocamente demostraran que la bronquiolitis viral en la infancia supone un riesgo elevado para el desarrollo de asma. Sin embargo, dos estudios prospectivos recientes, llevados a cabo por Sigurs et al y Stein et al han sido capaces de demostrar que el antecedente de una bronquiolitis por virus respiratorio sincitial (VRS) es un factor de riesgo para el desarrollo de sibilancias recurrentes y de asma diagnosticado por un médico.

De los distintos virus respiratorios, el VRS, hasta ahora el más conocido, ha sido el implicado con mayor frecuencia en el desarrollo de asma. Sin embargo, el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular, fundamentalmente la PCR, ha permitido conocer que otros virus respiratorios como el rinovirus se asocian con un riesgo incluso mayor de desarrollo de asma que el VRS.

Hay dos posibles teorías para explicar esta asociación entre bronquiolitis y asma. En la primera de ellas, se asume que el VRS afecta al sistema inmune y respiratorio del lactante, predisponiéndole a infecciones respiratorias recurrentes, hiperreactividad bronquial y secuelas pulmonares e inmunológicas a largo plazo. En la segunda, se plantea que los lactantes susceptibles podrían tener una función pulmonar previamente disminuida,

una susceptibilidad genética para el desarrollo de enfermedad pulmonar o ambas. Es posible que una combinación de ambas teorías se acerque más a la realidad que cualquiera de ellas por separado. Efectivamente, cada vez parece más claro que la interacción de distintos factores del virus, del huésped y de determinados factores genéticos, puede ser responsable del desarrollo de asma en la infancia. En el momento actual no está claramente establecido cómo cada uno de estos factores, independientemente o interactuando con los demás, influyen en el desarrollo de la enfermedad. Con objeto de determinar y definir la importancia de estos tres factores en la patogénesis del asma, se puso en marcha en el año 1.998 el estudio COAST (Childhood Origins of Asthma). El objetivo fue evaluar la relación entre los distintos factores ambientales, la disregulación de citoquinas y el desarrollo de enfermedades alérgicas y/o asma en una cohorte de 289 recién nacidos de alto riesgo por los antecedentes de asma y/o alergia de sus padres¹⁸⁷. En este estudio se evaluó, entre otros muchos parámetros, la relación entre la etiología de las infecciones virales y el desarrollo posterior de asma. Se observó que uno de los factores de riesgo más importantes para presentar sibilancias recurrentes a los 3 años de vida, eran las infecciones respiratorias. El hecho de haber sufrido al menos un episodio de sibilancias por VRS multiplicaba por 3 la probabilidad de desarrollar asma durante la infancia. Si la bronquiolitis había sido por rinovirus, la multiplicaba por 10 y si había estado ocasionada por otros virus distintos al VRS o al rinovirus, la multiplicaba por 3,9. Estos resultados parecían sugerir que la asociación entre bronquiolitis y asma no era exclusiva del VRS.

En los últimos años hemos asistido al descubrimiento de nuevos virus respiratorios, entre ellos el hMPV: Nuestro grupo, una vez analizados los datos de nuestros estudios iniciales, en los que se observó que el hMPV era uno de los agentes virales más frecuentemente implicados en la bronquiolitis del lactante y que su comportamiento en el episodio agudo era muy similar al del VRS, se planteó si la repercusión de las infecciones por hMPV podrían ser también similares a las del VRS a largo plazo. Por ello nos propusimos realizar un estudio que permitiera conocer la evolución, con respecto al desarrollo posterior de síntomas obstructivos de vías aéreas inferiores, de

los niños hospitalizados por un episodio de bronquiolitis por hMPV como infección sencilla y compararla con la de los niños hospitalizados por un episodio de bronquiolitis por VRS y con la de un grupo control de niños sin patología de vías aéreas inferiores en los dos primeros años de la vida. Nuestros resultados, además de confirmar la asociación de la bronquiolitis por VRS con el desarrollo de asma, han puesto de manifiesto por primera vez en la literatura, que el antecedente de bronquiolitis grave por hMPV es un factor de riesgo independiente, al menos tan importante como la bronquiolitis por VRS, para el desarrollo de síntomas respiratorios obstructivos a los 3 y a los 5 años de edad. El antecedente de bronquiolitis por hMPV multiplica por 5 el riesgo de desarrollar asma a largo plazo.

Se realizó un análisis multivariado, mediante regresión logística, de los posibles factores de riesgo para el desarrollo de asma, entre los que destacan: historia familiar de atopia y/o asma, tabaquismo en la familia, género masculino, dermatitis atópica, rinitis alérgica, alergia alimentaria, y presencia de animales domésticos en el domicilio, encontrando que la bronquiolitis por hMPV es el factor de riesgo independiente más importante para el desarrollo de asma (OR: 15.9; 95% CI 3.6, 70.5) Estos resultados apoyan la idea de que la bronquiolitis por hMPV, suficientemente grave como para requerir hospitalización, puede estar implicada en los mecanismos responsables del desarrollo de asma.

La metodología seguida en nuestro estudio garantiza la validez de los resultados. A diferencia de otras series, en las que se han incluido lactantes hospitalizados por sibilancias, independientemente de que fuera o no el primer episodio, en nuestro estudio, siguiendo la definición clásica de bronquiolitis propuesta por McConnochie¹⁸⁸, sólo se incluyeron los niños que presentaban su primer episodio de sibilancias. Otros problemas cuando se evalúa la frecuencia del asma en niños pequeños, son la dificultad para definir el asma en niños preescolares y la subjetividad y escasa consistencia de la información acerca de las sibilancias proporcionada por los padres¹⁸⁹. Nosotros empleamos la definición previamente empleada por Sigurs et al, de al menos tres episodios de obstrucción bronquial verificados por un médico y contactamos con los pediatras de los niños para comprobar los datos

referidos por los padres. De esta forma, aunque el seguimiento no ha sido prospectivo, se ha aumentado considerablemente la fiabilidad de los datos.

Aunque nuestro estudio ha sido el primero en poner de relieve la asociación entre bronquiolitis por hMPV y asma, sí se han publicado estudios realizados en ratones en los que se ha observado que la infección aguda por hMPV se asocia con inflamación pulmonar y enfermedad obstructiva de la vía aérea a largo plazo¹⁹⁰. La infección primaria por hMPV parece desencadenar una respuesta inmune adaptativa débil y aberrante, caracterizada por la inducción de una respuesta de citoquinas tipo Th2, que coincide con un aumento en la expresión de interleucina 10 y con la replicación persistente del virus en el pulmón¹⁹¹.

En definitiva, parece evidente que los lactantes hospitalizados con un episodio por hMPV tienen un riesgo elevado de desarrollar episodios recurrentes de sibilancias o asma en la infancia. Sin embargo, está por determinar si las infecciones virales contribuyen directamente a la inyección del asma o si simplemente identifican a los lactantes con riesgo de asma secundario a una alteración de la función pulmonar o a una predisposición genética. Son necesarios estudios que evalúen los factores genéticos y ambientales, incluyendo agentes virales específicos asociados con bronquiolitis y asma, para entender completamente la asociación entre estas dos enfermedades.

VI. CONCLUSIONES

1. Las infecciones por metapneumovirus humano, bocavirus humano y rinovirus son frecuentes en los niños ingresados por infección respiratoria. Hemos encontrado que el bocavirus humano y el rinovirus son los virus más frecuentes después del virus respiratorio sincitial. En nuestra serie, la frecuencia de bocavirus fue del 16.8% y la de rinovirus del 15.5%. El metapneumovirus humano, menos prevalente que los anteriores, ocupa un lugar destacado en las infecciones respiratorias graves de los lactantes, habiéndose detectado en el 11% de los casos.
2. Las manifestaciones clínicas asociadas con la infección por metapneumovirus humano, bocavirus humano y rinovirus afectan fundamentalmente a las vías aéreas inferiores. Episodio recurrente de sibilancias/crisis asmática, bronquiolitis y neumonía son, por este orden, los diagnósticos clínicos más frecuentes.
3. En comparación con las infecciones sencillas por VRS, las manifestaciones clínicas asociadas con las infecciones por metapneumovirus humano se relacionan más frecuentemente con sibilancias recurrentes/crisis asmática que con bronquiolitis. A diferencia del predominio invernal del virus respiratorio sincitial, el período de máxima circulación de hMPV tiene lugar en los meses de primavera. El resto de las características asociadas a la infección por ambos virus son muy similares.
4. En comparación con las infecciones sencillas por VRS, las infecciones sencillas por bocavirus humano afectan a niños de mayor edad y se asocian más frecuentemente con el diagnóstico de episodio recurrente de sibilancias/exacerbación asmática, así como con manifestaciones extrapulmonares. La tasa de coinfección de bocavirus humano con otros virus respiratorios es muy elevada (65%).

5. En comparación con las infecciones sencillas por VRS, los niños con infección por rinovirus fueron más frecuentemente varones, se diagnosticaron más a menudo de sibilancias recurrentes/crisis asmática y precisaron con menor frecuencia oxigenoterapia.
6. La frecuencia de detección de metapneumovirus humano, bocavirus humano y rinovirus en niños asintomáticos es significativamente menor que en niños con síntomas respiratorios.
7. La diferente frecuencia de detección de bocavirus humano en niños sanos y enfermos y la repercusión clínica asociada a las infecciones sencillas por bocavirus, apoyan el papel patogénico de este virus en las infecciones respiratorias de los niños.
8. El antecedente de bronquiolitis grave por metapneumovirus humano es un factor de riesgo independiente, al menos tan importante como la bronquiolitis por virus respiratorio sincitial, para el desarrollo de síntomas respiratorios obstructivos en la infancia.

VII. BIBLIOGRAFÍA

¹ Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions. *Pediatr Pulmonol* 2003;36:469-74.

² Fortea J, Gonzalez-Cuevas A, Juncosa T, Garcia-Fructuoso MT, Martinez F, Muñoz C, et al. Estudio de la etiología viral de las infecciones respiratorias de vías aéreas inferiores en una unidad neonatal. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998;16:453-5.

³ García García ML, Ordobás M, Calvo C, Gonzalez M, Aguilar J, Arregui A, et al. Infecciones virales de vías aéreas inferiores en lactantes hospitalizados: etiología, características clínicas y factores de riesgo. *An Esp Pediatr* 2001;55:101-7.

⁴ Adcock PM, Stout GG, Hauck MA, Marshall GS. Effect of rapid viral diagnosis on the management of children hospitalized with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:842-6.

⁵ van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de GR, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719-24.

⁶ Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der WS, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-76.

⁷ van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10:368-73.

⁸ Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79:884-95.

⁹ Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12891-6.

¹⁰ Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 2007;81:4130-6.

¹¹ Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 2007;3:e64.

¹² Dickens LE, Collins PL, Wertz GW. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 1984 Nov;52:364-9.

¹³ Blount RE, Jr., Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92:544-9.

¹⁴ Ruuskanen O, Ogra PL. Respiratory syncytial virus. *Curr Probl Pediatr* 1993;23:50-79.

-
- ¹⁵ Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF, Jr., Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr* 2000;137:865-70.
- ¹⁶ Krilov LR, Harkness SH. Inactivation of respiratory syncytial virus by detergents and disinfectants. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:582-4.
- ¹⁷ Kaplan NM, Dove W, bd-Eldayem SA, Abu-Zeid AF, Shamooun HE, Hart CA. Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan. *J Med Virol* 2008;80:168-74.
- ¹⁸ Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaecker N, Naranjo C, Van RM. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin Microbiol* 2007;45:3022-30.
- ¹⁹ Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet* 2006;368:312-22.
- ²⁰ Andrade MA, Hoberman A, Glustein J, Paradise JL, Wald ER. Acute otitis media in children with bronchiolitis. *Pediatrics* 1998;101(4 Pt 1):617-9.
- ²¹ Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* 2003;143(5 Suppl):S112-S117.

²² Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-5.

²³ Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1501-7

²⁴ Openshaw PJ, Dean GS, Culley FJ. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(2 Suppl):S58-S64.

²⁵ Lemanske RF, Jr., Dick EC, Swenson CA, Vrtis RF, Busse WW. Rhinovirus upper respiratory infection increases airway hyperreactivity and late asthmatic reactions. *J Clin Invest* 1989;83:1-10.

²⁶ Chanock RM, Parrott RH, Cook K, Andrews BE, Bell JA, Reichelderfer T, et al. Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. *N Engl J Med* 1958;258:207-13.

²⁷ Johnson KM, Chanock RM, Cook MK, Huebner RJ. Studies of a new human hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 1960;71:81-92.

²⁸ Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. *Vaccine* 2005;23:5708-24.

²⁹ Marx A, Torok TJ, Holman RC, Clarke MJ, Anderson LJ. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *J Infect Dis* 1997;176:1423-7.

³⁰ Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics* 2004;113:1758-64.

³¹ Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Brena P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatr Pulmonol* 2006;41:863-71.

³² Reed G, Jewett PH, Thompson J, Tollefson S, Wright PF. Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children < 5 years old. *J Infect Dis* 1997;175:807-13.

³³ Gardner SD. The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and serological studies of their prevalence. *J Hyg (Lond)* 1969;67:545-50.

³⁴ Aguilar JC, Perez-Brena MP, Garcia ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarria JE. Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:1191-5.

³⁵ Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001;344:1917-28.

³⁶ Karron RA, O'Brien KL, Froehlich JL, Brown VA. Molecular epidemiology of a parainfluenza type 3 virus outbreak on a pediatric ward. *J Infect Dis* 1993;167:1441-5.

³⁷ Glasgow KW, Tamblyn SE, Blair G. A respiratory outbreak due to parainfluenza virus type 3 in a home for the aged--Ontario. *Can Commun Dis Rep* 1995;21:57-61.

³⁸ Zambon M, Bull T, Sadler CJ, Goldman JM, Ward KN. Molecular epidemiology of two consecutive outbreaks of parainfluenza 3 in a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 1998;36:2289-93.

³⁹ Lee I, Barton TD. Viral respiratory tract infections in transplant patients: epidemiology, recognition and management. *Drugs* 2007;67:1411-27.

⁴⁰ Ison MG, Hayden FG. Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:355-67.

⁴¹ Laurichesse H, Dedman D, Watson JM, Zambon MC. Epidemiological features of parainfluenza virus infections: laboratory surveillance in England and Wales, 1975-1997. *Eur J Epidemiol* 1999;15:475-84.

⁴² Vachon ML, Dionne N, LeBlanc E, Moisan D, Bergeron MG, Boivin G. Human parainfluenza type 4 infections, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1755-8.

⁴³ Brady MT, Evans J, Cuartas J. Survival and disinfection of parainfluenza viruses on environmental surfaces. *Am J Infect Control* 1990;18:18-23.

⁴⁴ Lindquist SW, Darnule A, Istas A, Demmler GJ. Parainfluenza virus type 4 infections in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:34-8.

⁴⁵ Slavin KA, Passaro DJ, Hacker JK, Hendry RM, Kohl S. Parainfluenza virus type 4: case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:893-6.

⁴⁶ Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet* 2003;362:1733-45.

⁴⁷ Neuzil KM, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Thompson JM, Tollefson SJ, et al. Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study. *J Infect Dis* 2002;185:147-52.

⁴⁸ Zambon MC. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* 2001;11:227-41.

⁵⁰ Teo SS, Nguyen-Van-Tam JS, Booy R. Influenza burden of illness, diagnosis, treatment, and prevention: what is the evidence in children and where are the gaps? *Arch Dis Child* 2005;90:532-6.

⁵¹ Cunney RJ, Bialachowski A, Thornley D, Smaill FM, Pennie RA. An outbreak of influenza A in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:449-54.

⁵² Poehling KA, Edwards KM, Weinberg GA, Szilagyi P, Staat MA, Iwane MK, et al. The underrecognized burden of influenza in young children. *N Engl J Med* 2006;355:31-40.

⁵³ Miller EK, Griffin MR, Edwards KM, Weinberg GA, Szilagyi PG, Staat MA, et al. Influenza burden for children with asthma. *Pediatrics* 2008;121:1-8.

⁵⁴ Brotherton J, McIntyre P, Puech M, Wang H, Gidding H, Hull B, et al. Vaccine preventable diseases and vaccination coverage in Australia 2001 to 2002. *Commun Dis Intell* 2004;28 Suppl 2:vii-S116.

⁵⁵ Tsolia MN, Logotheti I, Papadopoulos NG, Mavrikou M, Spyridis NP, Drossatou P, et al. Impact of influenza infection in healthy children examined as outpatients and their families. *Vaccine* 2006;24:5970-6.

⁵⁶ Dagan R, Hall CB. Influenza A virus infection imitating bacterial sepsis in early infancy. *Pediatr Infect Dis* 1984;3:218-21.

⁵⁷ Munoz FM. Influenza virus infection in infancy and early childhood. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:99-104.

⁵⁸ Monto AS. Occurrence of respiratory virus: time, place and person. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(1 Suppl):S58-S64.

⁵⁹ Delgado RA, Picazo de la GJ. Gripe en el niño. Una enfermedad prevenible. *An Pediatr (Barc)* 2005;62:1-4.

⁶⁰ Calvo Rey C, García-García ML, Casas Flecha I, Martín del Valle F, Centeno Jiménez M, Pérez-Brena P. Infecciones por virus de la gripe en menores de dos años. *An Pediatr (Barc)* 2005;63:22-8.

⁶¹ Calvo C, García-García ML, Centeno M, Pérez-Brena P, Casas I. Influenza C virus infection in children, Spain. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1621-2.

⁶² Neuzil KM, Wright PF, Mitchel EF, Jr., Griffin MR. The burden of influenza illness in children with asthma and other chronic medical conditions. *J Pediatr* 2000;137:856-64.

⁶³ O'Brien KL, Walters MI, Sellman J, Quinlisk P, Regnery H, Schwartz B, et al. Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: the role of preceding influenza infection. *Clin Infect Dis* 2000;30:784-9.

⁶⁴ Ramet J, Weil-Olivier C, Sedlak W. Influenza vaccination: the paediatric perspective. *Vaccine* 2007;25:780-7.

⁶⁵ Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84:570-3.

⁶⁶ De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van DP, Van Doornum GJ, et al. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 1999;37:3940-5.

-
- ⁶⁷ Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, Choi EH, Park KH, Koh YY, et al. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001;32:1423-9.
- ⁶⁸ Garcia-Garcia ML, Calvo C, Martin F, Perez-Brena P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Arch Dis Child* 2006;91:290-5.
- ⁶⁹ Munoz FM, Galasso GJ, Gwaltney JM, Jr., Hayden FG, Murphy B, Webster R, et al. Current research on influenza and other respiratory viruses: II international symposium. *Antiviral Res* 2000;46:91-124.
- ⁷⁰ Manalo D, Mufson MA, Zollar LM, Mankad VN. Adenovirus infection in acute hemorrhagic cystitis. A study in 25 children. *Am J Dis Child* 1971;121:281-5.
- ⁷¹ Yun BY, Kim MR, Park JY, Choi EH, Lee HJ, Yun CK. Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:1054-9.
- ⁷² Leen AM, Rooney CM. Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients. *Br J Haematol* 2005;128:135-44.
- ⁷³ Munoz FM, Piedra PA, Demmler GJ. Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immunocompetent children. *Clin Infect Dis* 1998;27:1194-200.

-
- ⁷⁴ Simsir A, Greenebaum E, Nuovo G, Schulman LL. Late fatal adenovirus pneumonitis in a lung transplant recipient. *Transplantation* 1998;65:592-4.
- ⁷⁵ Pehler-Harrington K, Khanna M, Waters CR, Henrickson KJ. Rapid detection and identification of human adenovirus species by adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2004;42:4072-6.
- ⁷⁶ Wenman WM, Pagtakhan RD, Reed MH, Chernick V, Albritton W. Adenovirus bronchiolitis in Manitoba: epidemiologic, clinical, and radiologic features. *Chest* 1982;81:605-9.
- ⁷⁷ Versteegh FG, Mooi-Kokenberg EA, Schellekens JF, Roord JJ. Bordetella pertussis and mixed infections. *Minerva Pediatr* 2006;58:131-7.
- ⁷⁸ Kim CK, Kim SW, Kim JS, Koh YY, Cohen AH, Deterding RR, et al. Bronchiolitis obliterans in the 1990s in Korea and the United States. *Chest* 2001;120:1101-6.
- ⁷⁹ Harley D, Harrower B, Lyon M, Dick A. A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 3. *Commun Dis Intell* 2001;25:9-12.
- ⁸⁰ Asencio-Duran M, Romero-Martin R, Garcia-Martinez JR, Peralta-Calvo JM, Perez-Blanco V, Garcia-Caballero J, et al. Brote nosocomial de queratoconjuntivitis epidémica en una unidad de cuidados intensivos neonatal. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007;82:73-9.

⁸¹ Hsu HY, Kao CL, Huang LM, Ni YH, Lai HS, Lin FY, et al. Viral etiology of intussusception in Taiwanese childhood. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:893-8.

⁸² Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br Med J* 1965 5;1:1467-70.

⁸³ Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;121:190-3.

⁸⁴ Kahn JS, McIntosh K. History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(11 Suppl):S223-7.

⁸⁵ Williams JV. The clinical presentation and outcomes of children infected with newly identified respiratory tract viruses. *Infect Dis Clin North Am* 2005;19:569-84.

⁸⁶ Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6212-6.

⁸⁷ Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis* 2005;191:492-8.

⁸⁸ Monto AS. Medical reviews. Coronaviruses. *Yale J Biol Med* 1974;47:234-51.

⁸⁹ Bastien N, Anderson K, Hart L, Van CP, Brandt K, Milley D, et al. Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis* 2005;191:503-6.

⁹⁰ Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol* 2006;35:99-102.

⁹¹ Suzuki A, Okamoto M, Ohmi A, Watanabe O, Miyabayashi S, Nishimura H. Detection of human coronavirus-NL63 in children in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:645-6.

⁹² Pyrc K, Berkhout B, van der HL. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol* 2007;81:3051-7.

⁹³ Lau SK, Woo PC, Yip CC, Tse H, Tsoi HW, Cheng VC, et al. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2006;44:2063-71.

⁹⁴ van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med* 2005;2:e240.

⁹⁵ Esper F, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2005;191:499-502.

⁹⁶ Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, et al. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1154-7.

⁹⁷ Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;186:1330-4.

⁹⁸ Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:3043-5.

⁹⁹ Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2003;9:628-33.

¹⁰⁰ Freymouth F, Vabret A, Legrand L, Eterradosi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, et al. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:92-4.

¹⁰¹ Rotbart HA, Hayden FG. Picornavirus infections: a primer for the practitioner. *Arch Fam Med* 2000;9:913-20.

¹⁰² Temte JL. A family physician's perspective on picornavirus infections in primary care. *Arch Fam Med* 2000;9:921-2.

¹⁰³ Pitkaranta A, Hayden FG. Rhinoviruses: important respiratory pathogens. *Ann Med* 1998;30:529-37.

¹⁰⁴ Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 1989;56:839-47.

¹⁰⁵ Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 2):333-40.

¹⁰⁶ Papadopoulos NG, Sanderson G, Hunter J, Johnston SL. Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures. *J Med Virol* 1999;58:100-4.

¹⁰⁷ Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T. Human rhinoviruses. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:91-8.

¹⁰⁸ Vesa S, Kleemola M, Blomqvist S, Takala A, Kilpi T, Hovi T. Epidemiology of documented viral respiratory infections and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:574-81.

¹⁰⁹ Gwaltney JM, Jr. Acute community-acquired sinusitis. *Clin Infect Dis* 1996;23:1209-23.

¹¹⁰ Winther B, Alper CM, Mandel EM, Doyle WJ, Hendley JO. Temporal relationships between colds, upper respiratory viruses detected by polymerase chain reaction, and otitis media in young children followed through a typical cold season. *Pediatrics* 2007;119:1069-75.

¹¹¹ Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1285-9.

¹¹² Kotaniemi-Syrjanen A, Vainionpaa R, Reijonen TM, Waris M, Korhonen K, Korppi M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:66-71.

¹¹³ Lemanske RF, Jr., Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005 ;116:571-7.

¹¹⁴ Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol* 2004;42:79-82.

¹¹⁵ Weinberg A, Brewster L, Clark J, Simoes E. Evaluation of R-Mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2004;30:100-5.

¹¹⁶ Carballal G, Oubiña J. *Virología Clínica* 1996;21 Edición Bs As. Argentina.

¹¹⁷ Roviola F, Percivalle E, Zavattoni M, Torsellini M, Sarasini A, Campanini G, et al. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital. *J Med Virol* 2005;75:336-47.

-
- ¹¹⁸ Hindiyyeh M, Goulding C, Morgan H, Kenyon B, Langer J, Fox L, et al. Evaluation of BioStar FLU OIA assay for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 2000;17:119-26.
- ¹¹⁹ Weinberg A, Walker ML. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:367-70.
- ¹²⁰ Smit M, Beynon KA, Murdoch DR, Jennings LC. Comparison of the NOW Influenza A & B, NOW Flu A, NOW Flu B, and Directigen Flu A+B assays, and immunofluorescence with viral culture for the detection of influenza A and B viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:67-70.
- ¹²¹ Zheng X, Quianzon S, Mu Y, Katz BZ. Comparison of two new rapid antigen detection assays for respiratory syncytial virus with another assay and shell vial culture. *J Clin Virol* 2004;31:130-3.
- ¹²² Tsutsumi H, Ouchi K, Ohsaki M, Yamanaka T, Kuniya Y, Takeuchi Y, et al. Immunochromatography test for rapid diagnosis of adenovirus respiratory tract infections: comparison with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol* 1999;37:2007-9.
- ¹²³ Fujimoto T, Okafuji T, Ito M, Nukuzuma S, Chikahira M, Nishio O. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:5489-92.
- ¹²⁴ Kikuta H, Ebihara T, Endo R, Ishiguro N, Sakata C, Ochiai S, et al. Development of a rapid chromatographic immunoassay for detection of human metapneumovirus using monoclonal antibodies against nucleoprotein of hMPV. *Hybridoma (Larchmt)* 2007;26:17-21.

-
- ¹²⁵ Kikuta H, Sakata C, Gamo R, Ishizaka A, Koga Y, Konno M, et al. Comparison of a lateral-flow immunochromatography assay with real-time RT-PCR for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2008 ;46:928-32.
- ¹²⁶ Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2008;41:53-6.
- ¹²⁷ Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol* 2004;42:981-6.
- ¹²⁸ Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45:2116-22.
- ¹²⁹ Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004;42:1564-9.
- ¹³⁰ Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004;72:484-95.
- ¹³¹ Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol* 2001;39:1696-701.

-
- ¹³² Lee WM, Grindle K, Pappas T, Marshall DJ, Moser MJ, Beaty EL, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45:2626-34.
- ¹³³ Taggart EW, Hill HR, Martins TB, Litwin CM. Comparison of complement fixation with two enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to respiratory viral antigens. *Am J Clin Pathol* 2006;125:460-6.
- ¹³⁴ Van den Hoogen BG, Van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis* 2003;188:1571-7.
- ¹³⁵ Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1626-1628.
- ¹³⁶ Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, Bergeron MG, Dery P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:634-640.
- ¹³⁷ Døllner H, Risnes K, Radtke A, Nordbo SA. Outbreak of human metapneumovirus infection in Norwegian children. *Ped Infect Dis J* 2004;23:436-440.
- ¹³⁸ Ijpma FF, Beekhuis D, Cotton MF, Pieper CH, Kimpen JL, van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Osterhaus DM. Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *J Med Virol* 2004;73:486-493.

¹³⁹ Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:602-603.

¹⁴⁰ Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003;111:1407-1410.

¹⁴¹ Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarria M, Carballal G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* 2004;72:299-303.

¹⁴² Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Ragazzo V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infant in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:2987-2991.

¹⁴³ Falsey,A.R.; Erdman,D.; Anderson,L.J.; Walsh,E.E. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003;187:785-9.

¹⁴⁴ Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den Hoogen B, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1095-1101.

¹⁴⁵ Ebihara,T.; Endo,R.; Kikuta,H.; Ishiguro,N.; Yoshioka,M.; Ma,X.; Kobayashi,K..
Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol* 2003;70:281-3.

-
- ¹⁴⁶ Wolf,D.G.; Zakay-Rones,Z.; Fadeela,A.; Greenberg,D.; Dagan,R. High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. *J Infect Dis* 2003;188:1865-7.
- ¹⁴⁷ Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360:1393-1394.
- ¹⁴⁸ Esper F, Martinello R, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis* 2004;189:1388-1396.
- ¹⁴⁹ Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis.* 2003;187:1314-1318.
- ¹⁵⁰ Bosis S, Esposito S, Niersters HG, Crovari P, Osterhaus AD, Principi N. Impact of human metapneumovirus in childhood: comparison with respiratory syncytial virus and influenza virus. *J Virol* 2004;75:101-1044.
- ¹⁵¹ Terho Heikkinen, Riikka Österback, Ville Peltola, Tuomas Jartti, and Raija Vainionpää. Human Metapneumovirus Infections in Children. *Emerg Infect Dis* 2008;14:101-6.
- ¹⁵² Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:546-57.
- ¹⁵³ Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005;191:382-6.

-
- ¹⁵⁴ Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003;9:372-5.
- ¹⁵⁵ König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* 2004;42:4632-5.
- ¹⁵⁶ Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, Kikuta H. Detection of Human Bocavirus in Japanese Children with lower respiratory tract infections. *J Clin Microb* 2006;44:1132-4.
- ¹⁵⁷ Qu XW, Duan ZJ, Qi ZY, Xie ZP, Gao HC, Liu WP, et al. Human bocavirus infection, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 2007;13:165-8
- ¹⁵⁸ Foulongne V, Rodière M, Segondy M. Human Bocavirus in children. *Emerg Infect Dis* 2006;12:862-3.
- ¹⁵⁹ Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis*. 2006 Jul 11;6:109.
- ¹⁶⁰ Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter G, Halam N, Templeton K et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006; 194:1283-90.
- ¹⁶¹ Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12:848-50.
- ¹⁶² Smuts H, Hardie E. Human Bocavirus in Hospitalized Children , South Africa. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1457-8.

¹⁶³ Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194:1276-82.

¹⁶⁴ Kaplan N, Dove W, Abu-Zeid A, Shamooh H, Abd-Eldayem S, Hart A. Human Bocavirus Infection among Children, Jordan. *Emerg Infect Dis J* 2006;12:1418-9.

¹⁶⁵ Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters H, Lehtinen P, Österback R et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44:904-10.

¹⁶⁶ Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis* 2006;43:585-92.

¹⁶⁷ Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Häusler M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microbiol* 2007;45:1032-4.

¹⁶⁸ Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J Clin Microbiol* 2007;45:3218-23.

¹⁶⁹ Bastien N, Chui, N, Robinson JL; Lee BE, Dust K, Hart L, Li Y. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2007;610-3.

-
- ¹⁷⁰ Arnold J, Singh K, Spector S, Sawyer M. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis* 2006;43:283-8.
- ¹⁷¹ Monteny M, Niesters H, Moll H, Berger M. Hman bocavirus in febrile children, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2007;1:180-1.
- ¹⁷² Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007;13:636-7.
- ¹⁷³ Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007 1;195:1038-45.
- ¹⁷⁴ Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron MG, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis* 2008;14:217-21
- ¹⁷⁵ Fredericks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Kock's postulates. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:18-33.
- ¹⁷⁶ Sears MR, Johnston NW. Understanding the September asthma epidemic. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:526-9.
- ¹⁷⁷ Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995 13;310:1225-9
- ¹⁷⁸ Jacques J, Bouscambert-Duchamp M, Moret H, Carquin J, Brodard V, Lina B, et al. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. *J Clin Virol* 2006;35:463-6.

-
- ¹⁷⁹ Juvén T, Mertsola J, Waris M, Leinonen M, Meurman O, Roivainen M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:293-8.
- ¹⁸⁰ Cheuk DK, Tang IW, Chan KH, Woo PC, Peiris MJ, Chiu SS. Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:995-1000.
- ¹⁸¹ Nokso-Koivisto J, Kinnari TJ, Lindahl P, Hovi T, Pitkäranta A. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol* 2002 ;66:417-20.
- ¹⁸² van Benten I, Koopman L, Niesters B, Hop W, van Middelkoop B, de Waal L, et al. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2003 ;14:363-70.
- ¹⁸³ Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, et al. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophil analyses. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:785-90
- ¹⁸⁴ Johnston SL, Sanderson G, Pattemore PK, Smith S, Bardin PG, Bruce CB, et al. Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. *J Clin Microbiol* 1993;31:111-7.
- ¹⁸⁵ Redd SC. Asthma in the United States: burden and current theories. *Environ Health Perspect* 2002;110:557-60.
- ¹⁸⁶ Sigurs N, Gustafsson P, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, Kjellman B. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis

in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:137-41.

¹⁸⁷ Lemanske RF Jr. The childhood origins of asthma (COAST) study. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13 :38-43.

¹⁸⁸ McConnochie K. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child* 1983;137:11–13

¹⁸⁹ Cane Rs, Ranganathan SC, McKenzie SA. What do parents of wheezy children understand by “wheeze”? *Arch Dis Child* 2000;82:327–332.

¹⁹⁰ Hamelin ME, Prince GA, Gomez AM, Kinkead R, Boivin G. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* 2006;193:1634–42.
1642.

¹⁹¹ Alvarez R, Tripp RA. The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunity and impaired virus clearance in BALB/c mice. *J Virol* 2005;79:5971–5978.